

Proteinstudien.¹⁾

III. Mitteilung.

Über die Zusammensetzung und die Eigenschaften des mittels Ammoniumsulfats in krystallinischer Form ausgeschiedenen Eieralbumins.

Von

S. P. L. Sörensen und Margrethe Höyrup.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text und acht Abbildungen.

(Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juni 1918.)

Unsere Kenntnisse über die Zusammensetzung des «krystallisierten Eieralbumins» sind bisher sehr lückenhaft gewesen, was in den Schwierigkeiten, die eine quantitative analytische Untersuchung der Eieralbuminkrystalle darbietet, seinen Grund hat. Da es nicht möglich ist, die Krystalle in trockenem analysenreinen Zustand darzustellen, so hat man es versucht auf Umwegen Folgerungen über die Zusammensetzung des krystallisierten Proteinstoffs zu ziehen.

Franz Hofmeister, dem wir das erste Verfahren²⁾ zur Darstellung krystallisierten Eieralbumins, Fällung mittels Ammoniumsulfats, verdanken, brachte die durch Absaugen so weit als möglich von der Mutterlauge befreiten Krystalle unter Alkohol; dadurch ging das Albumin im Verlaufe einiger Stunden in die denaturierte, unlösliche Modifikation über, wonach das Ammoniumsulfat sich durch Auswaschen mit Wasser leicht entfernen ließ.

¹⁾ Wird gleichzeitig in englischer Sprache in den Comptes-Rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Bd. 12, S. 164 (1915—1917) veröffentlicht.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 14, S. 165 (1889), Bd. 16, S. 187 (1891).

Da die Krystalle durch diese Behandlung weder ihre Gestalt änderten noch Zeichen von Ätzung zeigten, so folgerte Hofmeister, daß das in der Krystallmasse gegenwärtige Ammoniumsulfat jedenfalls im wesentlichen von anhängender Mutterlauge herrührte, und nicht als integrierender Bestandteil den Krystallen gehört. Hofmeister benutzte deshalb solche durch Alkohol denaturierten und danach mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschenen Präparate, um die Zusammensetzung des krystallisierten Eieralbumins zu ermitteln.

Eine Reihe spätere Forscher haben entweder dasselbe oder ein ähnliches Verfahren wie Hofmeister angewandt, indem sie das krystallisierte Eieralbumin zuerst durch Behandlung mit Alkohol oder durch Erwärmen, oder bisweilen auf beiden Wegen, denaturiert, danach das denaturierte Präparat in angemessener Weise gewaschen und getrocknet, und schließlich das solchermaßen vorbereitete Material analysiert haben. Wir besitzen deshalb zahlreiche solche mit größter Sorgfalt ausgeführten Analysen.¹⁾ Die gegenseitige Übereinstimmung dieser von verschiedenen Forschern ausgeführten Analysen ist zwar nicht besonders gut, doch sind die Abweichungen nur bei einem Bestandteil, dem Schwefel, bedeutend. Wir haben keine Analysen dieser Art gemacht, indem es nämlich unzweifelhaft ist, daß man dadurch nur über die elementare Zusammensetzung der in das krystallisierte Eieralbumin eingetretenen Proteinsubstanz Aufklärung bekommt — und zwar noch dazu nur unter der Voraussetzung, daß die elementare Zusammensetzung des Eieralbumins durch die Denaturierung nicht geändert wird —, während die Analyse über die Zusammensetzung der Krystalle selbst nichts aussagt, und es ist besonders diese letztere Frage, auf welche wir unsere Aufmerksamkeit gerichtet haben. Eine so tiefgreifende Behandlung, wie eine Denaturierung mit nachfolgendem Waschen und Trocknen ist, kann eine wesentliche Änderung der Zusammensetzung herbeiführen, und es wird z. B. nicht möglich sein, auf diesem Wege etwas über einen eventuellen Gehalt der Krystalle an

¹⁾ Siehe z. B. O. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, Dritte Auflage, 1911, S. 184.

Wasser zu erfahren.¹⁾ Es ist deshalb auch eine verfrühte Folgerung, wenn O. Cohnheim in seinem oben zitierten Buche (S. 169) sagt, daß K. A. H. Mörner²⁾ bewiesen habe, daß die krystallisierten Albumine nicht aus freiem Albumin, sondern aus Albuminsulfat bestehen. Mörners Untersuchungen betreffen krystallisiertes, danach denaturiertes, ausgewaschenes und getrocknetes Albumin, und darauf darf man, wie oben betont, keine Folgerungen über die Zusammensetzung des krystallisierten Albumins ziehen. Mörner ist darüber selbst im Klaren, indem er schreibt (l. c. S. 250): «Ob auch die Krystalle des Serumalbumins (wie das koagulierte Albumin) aus einem Sulfat bestehen, habe ich noch nicht näher untersucht». Übrigens findet Mörner Schwefelsäure nur in den Serumalbuminpräparaten, nicht aber in den Eieralbuminpräparaten. Er schreibt (l. c. S. 282): «Die Menge der Schwefelsäure ist ganz unbedeutend. Es findet sich keine Berechtigung, von einem «Albuminsulfat» zu sprechen. Trotzdem daß das Ovalbumin und das Serumalbumin unter ganz ähnlichen Verhältnissen dargestellt und koaguliert worden waren, verhielten sich diese beiden Eiweißkörper ganz verschieden, indem das Serumalbumin Schwefelsäure aufnahm und so fest zurückhielt, daß sie nicht durch Waschen entfernt werden konnte, das Ovalbumin aber kein solches Säurebindungsvermögen zeigte».

Ein mehr zweckentsprechendes Verfahren hatte F. Gowland Hopkins³⁾ angewandt, um etwas über die Zusammensetzung des krystallisierten Eieralbumins zu erfahren.

¹⁾ Fr. N. Schulz (Diese Zeitschr., Bd. 29, S. 89 (1899)) hat, auf Elementaranalysen denaturierten ausgewaschenen und danach bei 105° getrockneten Eieralbumins fußend, gemutmaßt, daß das durch Säurezusatz (Kriegers oder Hopkins und Pinkus Methode) erhaltene krystallisierte Eieralbumin möglicherweise ein Hydrat des ohne Säurezusatz nach Hofmeisters Verfahren erhaltenen sein könnte. Daß dem nicht so ist, haben Thomas B. Osborne und George F. Campbell dargetan (Journ. Am. Chem. Soc., Bd. 22, S. 441 (1900)) und es war wohl, wie oben ausgesprochen, auch kaum denkbar, daß ein eventueller Gehalt an Hydratwasser in einem bei 105° getrockneten Präparate sich zu erkennen geben sollte.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 34, S. 207 (1901).

³⁾ Journ. of Physiologie, Bd. 25, S. 320 (1900).

Hopkins hat gefunden, daß die Eieralbuminkrystalle mit einer gesättigten Lösung von Natriumchlorid in 1-prozentiger Essigsäure behandelt werden können, ohne daß sie weder denaturiert werden, noch die Form, noch das Aussehen überhaupt ändern, und er hat deshalb eine solche Lösung benutzt, um die den Krystallen anhängende Mutterlauge zu beseitigen. Da es sich nun zeigte, daß die Eieralbuminkrystalle nach einem solchen sorgfältigen Waschen nicht die geringste Spur von Schwefelsäure enthielten, so folgerte Hopkins, daß die Krystalle wahrscheinlich nur aus Eieralbumin bestehen, nicht aber Ammoniumsulfat enthalten. Hopkins drückt sich sehr vorsichtig aus (l. c. S. 323): «It may be that such results are not actually conclusive, and that associated ammonium sulphate might be removed from the crystal during treatment, without altering its more obvious optical characters. It is however very difficult to see what kind of evidence could be obtained with regard to this question other than the proof that washing may leave the form of the crystal intact and the proteid unaltered, and yet remove all sulphate. Such evidence appears to suggest very strongly that the proteid crystals are formed under the influence of the electrolyte, but not in association with it».

Wir können den Betrachtungen Hopkins beipflichten, indem wir jedoch bemerken, daß seine Versuche nur die Frage, wie weit die Krystalle schwefelsäurefrei sind, behandeln, nichts aber darüber aussagen, ob sie Ammoniak enthalten oder nicht. Übrigens wird diese ganze Frage im folgenden eine eingehende Behandlung finden (s. Abschnitt C, S. 243), wo man eine Beschreibung über eine Reihe von Versuchen findet, die wir nach dem Hopkins'schen Prinzip ausgeführt haben.

Ein drittes Verfahren, welches auf ganz anderen Prinzipien als den beiden oben erwähnten fußt, hat G. Galeotti¹⁾ angewandt, um zu entscheiden, ob das krystallisierte Eieralbumin lediglich aus Eieralbumin besteht, oder ob es auch noch Ammoniumsulfat enthält. Galeotti hat die Eieralbuminkry-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 44, S. 461 (1905).

stalle zwischen Filtrierpapier gepreßt, dadurch den größten Teil der anhaftenden Mutterlauge beseitigt, und sodann das Gewicht der weichen teigigen Masse nebst ihrem Gehalt an Wasser, Ammoniumsulfat und Eieralbumin bestimmt. Zu gleicher Zeit bestimmte er die in abgewogenen Mengen des Filtrats gegenwärtigen Mengen derselben Stoffe, Wasser, Ammoniumsulfat und Eieralbumin. Galeotti ging nun davon aus, daß alles Wasser, das er in den Krystallen fand, von der anhaftenden Mutterlauge herrührte, und dann konnte er auf Grund der Analyse des Filtrats berechnen, wieviel Mutterlauge die teigartige Krystallmasse enthielt, und wieviel Eieralbumin und Ammoniumsulfat dieser Menge von Mutterlauge entsprach. Es zeigte sich dann, daß die von der Mutterlauge stammende Menge Ammoniumsulfat eben dieselbe war, wie der ganze Gehalt der Krystallmasse an diesem Stoffe, woraus Galeotti folgerte, daß die Krystalle lediglich aus Eieralbumin bestanden und kein Ammoniumsulfat enthielten.

Das von Galeotti verwertete Prinzip ist dasselbe, auf welchem die in einer früheren Abhandlung¹⁾ beschriebene analytische Methode sich gründet, welcher wir den Namen «die Proportionalitätsmethode» beigelegt und mit gutem Erfolg an der hier behandelten Frage angewandt haben. Wir sind indessen zu einem ganz anderen Resultat als Galeotti gelangt, indem wir — wie es im folgenden des näheren dargetan werden wird (s. Abschnitt A, S. 217) — durch sorgfältig ausgeführte, sehr umfassende Versuche gefunden haben, daß die Krystalle außer dem Eieralbumin noch bedeutende Mengen Wasser enthalten. Einer solchen Auslegung sind die Resultate Galeottis nicht fähig; er führt nur das Zahlenmaterial eines einzelnen Versuches an, und aus demselben erhellt, daß, selbst wenn der ganze Wassergehalt der Krystallmasse lediglich von anhaftender Mutterlauge herrührt, so wird die demselben entsprechende Menge Ammoniumsulfat jedoch um ein unbedeutendes (0,0005 g) kleiner sein als die Gesamtmenge Ammoniumsulfat, welche in der Krystallmasse gefunden wurde. Es kann deshalb keine

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 46 (1918).

Rede davon sein, daß die Krystalle Wasser enthalten, es sei denn, daß man — ganz willkürlich — annehmen wird, daß sie auch noch dazu Ammoniumsulfat enthalten.

Die Ursache dieser Unstimmigkeit zwischen den Versuchsergebnissen Galeottis und den unsrigen können wir nicht mit Bestimmtheit angeben, sie könnte aber durch die Annahme erklärt werden, daß bei Galeottis Versuchen verhältnismäßig mehr Wasser als Ammoniumsulfat durch das Pressen der teigigen Krystallmasse aus derselben entfernt worden sei; wir denken natürlich zunächst an eine Verdampfung von Wasser. Wenn diese Erklärung stichhaltig ist, dann muß in Galeottis Versuchen der Wasserverlust durch einen sonderbaren Zufall eben von einer solchen Größe gewesen sein, daß er dem Wassergehalt der Krystalle gleich geworden ist. Wie es sich auch damit verhalten mag, so meinen wir, auf den im folgenden beschriebenen Versuchen fußend, mit aller Sicherheit aussagen zu können, daß krystallisiertes Eieralbumin — im Gegensatz zu Galeottis Befunden — bedeutende Wassermengen enthält.

Die oben erwähnten drei Verfahrensweisen sind die wichtigsten der Wege, auf welchen man einen Einblick in die Zusammensetzung des krystallisierten Eieralbumins zu erhalten gesucht hat. Eine erschöpfende Erwähnung der Behandlung dieser Frage in der vorliegenden ziemlich reichhaltigen Literatur wird uns nicht vonnöten scheinen, nur eine einzelne Bemerkung mögen wir noch hinzufügen.

Thomas B. Osborne¹⁾ hat gefunden, daß Lösungen von krystallisiertem Eieralbumin durch sorgfältige Dialyse und nachfolgende Einengung bei 50° Produkte geben, deren wässerige Lösungen sauer gegen Lackmus reagieren und meßbare Mengen 0,1 n-Kaliumhydroxydlösung verlangen, um diesem Indikator gegenüber neutral zu werden, und noch größere Mengen, bevor neutrale Reaktion Phenolphthalein gegenüber eintritt. Hieraus folgert Osborne, daß krystallisiertes Eieralbumin eine Verbindung von Eieralbumin und einer Säure ist, deren Natur genauer zu ermitteln er nicht imstande gewesen ist. Daß dieser

¹⁾ Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. 21, S. 477 (1899).

Folgerung Osbornes jegliche Grundlage fehlt, wird indessen einleuchtend, wenn man sich der in einer früheren Abhandlung¹⁾ erwähnten Versuche über die Dialyse ammoniumsulfathaltiger Eiweißlösungen erinnert.

Wegen der während der Dialyse vorgehenden hydrolytischen Prozesse wird es unmöglich sein, aus der Zusammensetzung des Stoffes nach der Dialyse etwas über die Zusammensetzung der Krystalle, bevor die Lösung und die Dialyse stattgefunden hat, zu folgern; übrigens ist das von Osborne gefundene Verhalten der Eieralbuminlösungen beim Titrieren zu neutraler Reaktion Lackmus und Phenolphthalein gegenüber leicht verständlich, wenn man das Eieralbumin als einen Ampholyten mit überwiegend saurem Charakter betrachtet, wie es in der vorhergehenden Abhandlung²⁾ des näheren entwickelt worden ist.

Im folgenden wird die Frage nach der Zusammensetzung der Eieralbuminkrystalle eine eingehende auf einem umfassenden Versuchsmaterial gestützte Erörterung finden. In den drei ersten Abschnitten werden wir die Fragen nach dem eventuellen Gehalt des krystallisierten Eieralbumins beziehungsweise an Wasser (Abschnitt A), an überschüssiger Schwefelsäure oder überschüssigem Ammoniak (Abschnitt B) und an Ammoniumsulfat (Abschnitt C) behandeln, während der letzte Abschnitt (D) einige Bemerkungen betreffs des Charakters des Krystallisationsprozesses und der Form der Krystalle enthalten wird.

A. Enthält das krystallisierte Eieralbumin Wasser?

Bei der Erwähnung der Proportionalitätsmethode³⁾ ist ausführlich mitgeteilt worden, wie man mittels einer Kombination der Analyse des «Filtrats» und der des «Niederschlags mit anhaftender Mutterlauge» Kenntnisse über die Zusammensetzung des von anhaftender Mutterlauge befreiten Niederschlags erhalten kann. Es wurde gezeigt, daß, wenn man das Gewicht des

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 29 u. f. (1918).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 104 (1918).

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 46 (1918).

wie auch die Ammoniumsulfatlösung hatten vor der Mischung eine Temperatur von 19° , und nach derselben wurde die Masse in einem mit einem Kautschuckstöpsel geschlossenen Kolben bei 19° der Krystallisation überlassen, dieselbe dauerte 11 Tage im ganzen, während welcher Zeit der Kolben jeden Tag gut geschüttelt wurde.

Nach 11 Tagen wurde im Thermostaten bei 19° filtriert; um Verdampfung zu vermeiden, benutzten wir eine der gewöhnlichen konischen Filtrierflaschen, mit eingeschliffenem Trichter, dessen oberer Rand geschliffen und mit einer zuge Schliffenen Glasplatte bedeckt war; dieselbe hatte in der Mitte ein Loch, in welches ein gebogenes Glasrohr luftdicht eingesetzt war, und dieses Rohr verband ein Kautschuckschlauch mit dem Seitenansatz der Filtrierflasche. Der Adsorptionsfähigkeit des Filtrierpapiers wegen wurden die zuerst durchgelaufenen 20 ccm nicht benutzt, aber in einen Meßcylinder gesammelt und dann erst der Trichter in die Filtrierflasche gebracht.

Als die Filtrierung nach etwa 4 Stunden beinahe beendet war, wurden $3 \cdot 50$ ccm des Filtrats abgemessen, gewogen und zur Analyse des Filtrats benutzt. Aus der auf dem Filter zurückgebliebenen Masse wurde die noch nicht durchgelaufene über dem Niederschlag stehende Mutterlauge mittels einer Pipette entfernt, wonächst Niederschlag und der Rest der Mutterlauge so schnell wie nur möglich auf dem Filter mittels eines Spatels gemischt wurden. Aus der solchermaßen erhaltenen breiartigen Mischung von Niederschlag und Mutterlauge wurden mittels einer Pipette mit abgebrochener Spitze 3 Proben genommen, jede auf 10 ccm, die vorsichtig in je einen gewogenen 100 Kubikzentimeter-Meßkolben gebracht wurden, wonach man das Gewicht des Niederschlags mit anhaftender Mutterlauge durch Wägen ermittelte. Nach Auflösen in Wasser und Verdünnen bis auf 100 ccm wurde aufs neue gewogen, und sodann nach gutem Schütteln aus jeder der drei Proben $4 \cdot 10$ ccm herauspipettiert, welche gewogen und zur Analyse des Niederschlages mit anhaftender Mutterlauge benutzt wurden.

Die Analysen führten wir nach dem früher¹⁾ beschriebenen Verfahren aus, indem der Proteinstickstoff nach der Methode b (l. c. 59), der Ammoniakstickstoff im Filtrate nach der Methode d (l. c. 61) und der Ammoniakstickstoff des Niederschlags nach der Methode e (l. c. 63) bestimmt wurden. Die Analysenresultate sind in der Tabelle 33 zusammengestellt.

Die Tabelle enthält das ganze zu diesem Versuch gehörige Zahlenmaterial, das keine nähere Erläuterung verlangt, und welches durch verhältnismäßig einfache Rechenoperationen die Größen a_f , p_f , a_b und p_b gibt, aus welchen Größen r sich wieder berechnen läßt.

Derartige Versuche haben wir nicht ganz wenige durchgeführt, indem wir die Krystallisationsbedingungen verschiedenerweise variierten. Eine Übersicht über diese Versuche

Tabelle 33.

Filtrat

Nr. des Kolbens	Abge- wogene Menge g	Nach Koagulieren, Filtrieren usw.			
		Gewicht 1 l g	100 ccm wogen g	Ammoniak-N entsprach ccm ca. $n/14,01$ Thio- sulfatlösung ²⁾	wurde im Nie- derschlag der Protein-N be- stimmt; der- selbe entspr. ccm ca. $n/14,01$ Thiosulfat- lösung ³⁾ .
4	56,333	1006,68	{ 10,066 10,081 10,080	{ 26,58 26,63 26,65	{ 13,33
11	56,357	1006,70	{ 10,036 10,036 10,026	{ 26,58 26,54 26,53	{ 13,33
12	56,386	1006,81	{ 10,025 10,017 10,030	{ 26,51 26,53 26,54	{ 13,34
Mittel...	56,359	1006,73	10,044	26,565	13,33

100 g Filtrat enthalten demnach 4,6966 g Ammoniak-N (a_f)

100 „ „ „ „ „ 0,0235 „ Protein-N (p_f).

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 59 u. f. (1918).

²⁾ $0,9941 \cdot n/14,01$.

³⁾ $0,9924 \cdot n/14,01$.

Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge.

Nr. des Kolbens	Von den 100 ccm wurden 4 · 10 ccm entnommen Gewicht g	Der Ammoniak-N in 10 ccm entsprach ccm ca. $\frac{n}{14,01}$ Thio-sulfatlösung ¹⁾	Der Protein-N in 10 ccm entsprach ccm ca. $\frac{n}{14,01}$ Thio-sulfatlösung ²⁾
Die Probe I wog 11,4526 g, zu 100 ccm gelöst war das Gewicht 101,354 g			
13	10,100	2 · 21,53	29,72
14	10,093	2 · 21,59	29,64
15	10,106	2 · 21,62	29,68
17	10,103	2 · 21,51	29,79
Mittel	10,1005	2 · 21,563	29,71
100 g der Probe I enthalten demnach 3,7563 g Ammoniak-N (a_b)			
100 » » » I » » » 2,5834 » Protein-N (p_b).			
Die Probe II wog 11,6101 g, zu 100 ccm gelöst war das Gewicht 101,444 g			
21	10,159	2 · 21,67	31,62
22	10,171	2 · 21,68	31,37
25	10,174	2 · 21,69	31,40
27	10,170	2 · 21,69	31,33
Mittel	10,1685	2 · 21,682	31,43
100 g der Probe II enthalten demnach 3,7042 g Ammoniak-N (a_b)			
100 » » » II » » » 2,6802 » Protein-N (p_b).			
Die Probe III wog 11,0118 g, zu 100 ccm gelöst war das Gewicht 101,313 g			
29	10,100	2 · 20,71	29,29
30	10,115	2 · 20,63	29,31
31	10,066	2 · 20,49	29,24
32	10,129	2 · 20,57	29,49
Mittel	10,1025	2 · 20,600	29,33
100 g der Probe III enthalten demnach 3,7300 g Ammoniak-N (a_b)			
100 » » » III » » » 2,6508 » Protein-N (p_b).			

¹⁾ 0,9941 · $\frac{n}{14,01}$.

²⁾ 0,9924 · $\frac{n}{14,01}$.

Wendet man die Formel

$$r = 100 \frac{(a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f}$$

auf diese Versuchsergebnisse an, erhält man aus:

- Filtrat und Probe I: $r = 7,80,$
- » » » II: $r = 7,93,$
- » » » III: $r = 7,81,$
- Mittel: $r = 7,85,$

und die dadurch erhaltenen Werte von r findet man in der Tabelle 34.

Diese Tabelle ist einer weiteren Erläuterung kaum bedürftig, wir begnügen uns mit einer Hinweisung auf die im dritten, vierten und fünften senkrechten Stab angeführten Bemerkungen über die Krystallisationsbedingungen. Daraus ist zu ersehen, daß wir die Versuchstemperatur von 4 bis 24° und die Krystallisationszeit von 2 bis 12 Tagen variiert haben. Wir haben sowohl frische als auch ältere Eier benutzt. Wir haben das Auskrystallisieren schnell oder langsam vor sich gehen lassen, wir haben fraktionierte Krystallisation angewandt, und schließlich haben wir in ein paar Versuchen bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen krystallisieren lassen.

Bei den Versuchen mit fraktionierter Krystallisation (Nr. 10, 11 und 12) würde man — nach den von Sven Odén¹⁾ an fraktionierter Fällung kolloider Schwefellösung gemachten Erfahrungen — erwarten, daß ein eventueller Unterschied des Dispersitätsgrads des Eieralbumins sich fühlbar machen würde; der Wert von r ist indessen, wie aus dem letzten Stab der Tabelle hervorgeht, derselbe in allen drei Versuchen, indem die Abweichungen völlig innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler fallen. Etwas ganz Ähnliches gilt von den gesamten ausgeführten Versuchen; die einzige Ausnahme wäre dann der in der Tabelle zuletzt angeführte Versuch, mit $r =$ etwa 7,97; dieses hat aber seine natürliche Ursache darin, daß die Auskrystallisation in ausgeprägt saurer Flüssigkeit vorgegangen ist. Unter solchen Umständen krystallisiert das Eieralbumin, wie es im folgenden Abschnitt (siehe S. 233) erwähnt wird, mit einer geringen, aber leicht nachzuweisenden und zu wägenden Menge Schwefelsäure, und der Faktor r wird in diesem Fall sowohl dem Wasser als auch dem Säuregehalt entsprechen; wird für letzteren korrigiert (siehe S. 235, Anm.), so wird der Wert des r sich dem normalen, 7,86, nähern.

¹⁾ Zeitschrift f. physik. Chem., Bd. 78, S. 682 (1911) Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis IV, Bd. 3, Nr. 4, S. 55 (1912).

Wir meinen es dann durch die in der Tabelle 34 mitgeteilten Versuche als dargetan betrachten zu dürfen, daß der Faktor (eventuell mit einer kleinen Korrektur versehen) einen von den Krystallisationsbedingungen unabhängigen, konstanten Wert besitzt, dessen Größe wir gleich 7,86 gefunden haben.

Welche Bedeutung ist jetzt dem Faktor r beizumessen? Es wurde oben (S. 218) gesagt, daß r unter der Voraussetzung, daß das krystallisierte Eieralbumin kein Ammoniumsulfat enthält, gleich x ist und deshalb denjenigen Faktor angibt, mit welchem der Proteinstickstoff multipliziert werden muß, um das Gewicht des wasserhaltigen Proteins zu geben. Die Frage ist dann, ob diese Voraussetzung stichhaltig ist.

Schon bei der in einer vorausgegangenen Abhandlung gegebenen ausführlichen Erwähnung der Proportionalitätsmethode¹⁾ wurde die Aufmerksamkeit darauf hingelenkt, daß, da die allgemeine Gleichung

$$z = r + s \cdot y$$

zwei Unbekannte, z und y , enthält, so ist es nicht möglich, mittels eines einzelnen Versuches, dessen Analyseresultate nur eine Berechnung von r und s erlauben, eine eindeutige Lösung der Gleichung zu erhalten; ein willkürlich gewählter Wert von y wird einen entsprechenden Wert von z geben. Eine absolute Beantwortung der Frage ist deshalb aus den oben erwähnten Versuchen nicht zu erhalten.

Zieht man indessen in Betracht, daß die Proportionalitätsmethode auf einer Differenzbestimmung eines bestimmten Stoffes (hier des Ammoniakstickstoffs) im Filtrat und im Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge fußt, so leuchtet es unmittelbar ein, daß ein eventueller Gehalt an Ammoniumsulfat als integrierender Bestandteil der Krystalle eine um so größere Rolle spielen wird, je kleiner die Ammoniumsulfatkonzentration des Filtrats ist. Anders gesagt: man wird — der

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 50 (1918).

Tabelle

Übersicht über die Größe des Faktors, r, wie er sich

mittels der Formel $r = \frac{100 (a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f}$ berechnet.

Nr. des Versuches	Tag des Versuches	Temperatur des Versuches	Dauer der Krystallisation Tage	Bemerkung	100 g Filtrat enthielten		100 g Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge enthielten			Mittel von r			
					Ammoniak-N in g (a _f)	Protein-N in g (p _f)	Marke der Probe	Ammoniak-N in g (a _b)	Protein-N in g (p _b)		r		
1	April 1913	5°	2	Variation der Versuchstemperatur und der Krystallisationsdauer.	4,7000	0,0238	I	3,8960	2,1871	7,89 ₀	7,87 ₀		
2	"	18°	2		II	3,8520	2,3045	7,89 ₀	III	3,9220		2,1267	7,85 ₀
3	"	11°	12		I	4,1050	1,6332	7,73 ₀	II	4,0330		1,7983	7,87 ₀
4	"	24°	4		III	4,1400	1,5170	7,83 ₀	I	4,1574	1,7978	7,82 ₀	7,81 ₀
5	Oktober 1913	4°	3		II	4,2147	1,6581	7,76 ₀	III	4,2982	1,4332	7,78 ₀	
6	"	24°	3		I	4,0990	2,1870	7,89 ₀	II	4,0300	2,0980	7,92 ₀	
7	Nov. 1913	18°	10		III	4,0610	2,0240	7,89 ₀	I	4,0910	1,5940	7,73 ₀	7,90 ₀
8	"	19°	11		II	4,0210	1,7480	7,91 ₀	III	4,0580	1,6630	7,84 ₀	
9	"	19°	11		I	3,7600	2,4700	7,87 ₀	II	3,7620	2,4670	7,86 ₀	
10	Mai 1914	19°	5		III	3,8050	2,3730	7,78 ₀	I	3,6791	2,9043	7,92 ₀	7,84 ₀
11	"	19°	5		II	3,7155	2,8381	7,84 ₀	III	3,6872	2,8763	7,94 ₀	
12	"	19°	5		I	3,7563	2,5834	7,80 ₀	II	3,7042	2,6802	7,93 ₀	
13	April 1915	19°	9		III	3,7300	2,6508	7,81 ₀	I	3,5429	3,0945	7,95 ₀	7,94 ₀
14	"	19°	9		II	3,5465	3,0965	7,92 ₀	III	3,5481	3,0791	7,95 ₀	
				I	3,0827	3,2368	7,86 ₀	II	3,0906	3,2056	7,88 ₀		
				III	3,0683	3,2886	7,84 ₀	I	3,1788	3,6617	7,83 ₀	7,86 ₀	
				II	3,2784	3,3710	7,84 ₀	III	3,2062	3,5855	7,82 ₀		
				I	4,6834	1,7372	7,82 ₀	II	4,5685	2,0139	7,79 ₀		
				III	4,5685	2,0139	7,79 ₀	I	3,2179	3,4069	7,92 ₀	7,83 ₀	
				II	3,2120	3,4242	7,92 ₀	III	3,2236	3,3961	7,91 ₀		
				I	3,4264	2,7959	8,00 ₀	II	3,4769	2,6641	7,96 ₀		
				III	3,3910	2,9184	7,93 ₀					7,96 ₀	
Mittel der ersten 12 Werte:										<u>7,86</u>			

Es wurde beim Versuche eine aus älteren Eiern dargestellte Probe Eialbumin angewendet, welche übrigens gut, aber sehr langsam krystallisierte.

„Schnell“ Diese beiden Versuche wurden gleichzeitig und ganz gleich behandelt, nur wurde beim ersten die ganze Menge Ammoniumsulfat auf einmal zugegeben, so daß die Krystallisation sehr schnell vor sich ging.

„Langsam“ Beim zweiten wurde das Ammoniumsulfat nach und nach zugegeben, derart, daß die Krystallisation sich nur langsam vollstreckte.

Beim ersten dieser drei Versuche war die Ammoniumsulfatmenge so geringfügig, daß nur ein kleiner Teil des Eialbumins auskrystallisierte. Das Filtrat vom ersten Versuch wurde zum zweiten Versuch benutzt, indem mehr Ammoniumsulfat zugefügt wurde und das Filtrat von diesem in derselben Weise zum dritten Versuch. Durch eine solche fraktionierte Krystallisation könnte ein eventueller Unterschied im Dispersitätsgrad des Eialbumins möglicherweise zum Vorschein kommen.

Während die Wasserstoffionenkonzentration beim ersten dieser Versuche ungefähr die für diese Amkrystallisationen normale war, so war sie im zweiten Versuch weit größer als üblich, indem das Filtrat $p_{H^+} = 4,417$; $h = 38,28 \cdot 10^{-6}$ zeigte. (S. übrigens S. 235 Anm.).

angewandten Methode wegen — in zwei Versuchen mit verschiedener Konzentration des Ammoniumsulfats für r nicht denselben, aber einen um so kleineren Wert finden, je kleiner diese Konzentration ist, und dieser Unterschied wird desto stärker hervortreten, je mehr Ammoniumsulfat die Krystalle enthalten.

Dasselbe Resultat enthält man durch Betrachtung der Formel für r , die — wie früher erwähnt (l. c. S. 51) mit sehr großer Annäherung als

$$r = \frac{100}{p_b} \left(1 \div \frac{a_b}{a_f} \right)$$

geschrieben werden kann.

Wenn der Ammoniakstickstoff, a_b , nicht lediglich von der anhaftenden Mutterlauge herrührt, sondern ein Teil davon, a_k , ein Bestandteil der Krystalle ist, während der Rest, a_m , der anhaftenden Mutterlauge gehört und deshalb unter sonst gleichen Umständen (gleicher Wert von p_b) in einem bestimmten Verhältnis zu a_f steht, so wird man die Gleichung als

$$r = \frac{100}{p_b} \left(1 \div \frac{a_m}{a_f} \div \frac{a_k}{a_f} \right)$$

schreiben können.

Wenn jetzt $\frac{a_m}{a_f}$ für einen bestimmten Wert von p_b konstant ist, so sieht man leicht, daß die Formel einen um so kleineren Wert für r gibt, je kleiner a_f (der Gehalt des Filtrats an Ammoniumsulfat) und je größer a_k (die in den Krystallen enthaltene Menge Ammoniumsulfat) ist.

Da nun in den von uns angestellten, in Tabelle 34 aufgeführten Versuchen der Wert von r nicht mit derjenigen von a_f variiert, so meinen wir daraus die Folgerung ziehen zu dürfen, daß die Eieralbuminkrystalle wahrscheinlicherweise entweder ammoniakfrei sind oder nur ganz kleine Mengen Ammoniumsulfat enthalten. In einem folgenden Abschnitt (C. S. 243) werden wir es versuchen, dieser Frage durch ganz andersartige Untersuchungen näher zu treten.

Betreffs des Wassergehalts der Krystalle, dann läßt sich derselbe selbstverständlich mittels des Faktors $r = x = 7,86$ berechnen, wenn man den Faktor kennt, mit welchem der Proteinstickstoff zu multiplizieren ist, um das Gewicht des wasserfreien Proteins zu geben. Diesen letzteren Faktor haben wir durch Eintrocknen einer Proteinlösung gekannter Zusammensetzung zu bestimmen gesucht. Das Verfahren war wie folgt:

In eine Reihe von gewogenen breiten Wägegläsern mit eingeschliffenem Stöpsel wurden 10 oder 20 ccm einer Eieralbuminlösung abgemessen und gewogen, welche Lösung 0,7825 g Proteinstickstoff und 0,099 g Ammoniumsulfat in 100 g, aber weder Schwefelsäure noch Ammoniak im Überschuß, enthielt. Einige dieser Proben wurden ohne jegliche Vorbehandlung eingetrocknet, andere wurden zuerst 5 Stunden in einen Brutkasten bei 55—60° gestellt, wodurch eine teilweise Koagulation stattfand, während der Rest der Proben vor dem Eintrocknen $\frac{3}{4}$ Stunden bei 93—97° gestellt wurde, was die ganze Masse in ein steifes Gelé verwandelte. Das Eintrocknen geschah im Vakuum über festem Kaliumhydroxyd bei Zimmertemperatur und wurde einige Monate hindurch fortgesetzt, bis der Gewichtsverlust während eines Monats weniger als 1 Milligramm betrug. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 35 zusammengestellt.

Es erhellt aus den 7 ersten senkrechten Stäben der Tabelle, welche keine weitere Erklärung nötig haben, daß der gesuchte Faktor sehr nahe 6,4 ist, indem die Mittelzahl aller Bestimmungen 6,39₂ ist. Die Vorbehandlung der Lösung schien keinen nachweisbaren Einfluß auf die Größe des Faktors geübt zu haben, indem die gegenseitigen Abweichungen der einzelnen Versuche sehr wohl von Versuchsfehlern her stammen können. Daß der Faktor bei den nicht vorbehandelten Proben (Nr. 1—4) ein wenig kleiner als bei den übrigen Proben gefunden wird, und daß von letzteren die völlig koagulierten Proben (Nr. 9—12) einen ein wenig niedrigeren Faktor als die teilweise koagulierten (Nr. 5—8) geben, muß demnach als von Zufälligkeiten herrührend betrachtet werden. Der Unterschied ist jedenfalls so geringfügig, daß wir es um der hier

behandelten Frage willen nicht notwendig gefunden haben, durch weitere Untersuchungen festzulegen zu suchen, ob hier von Zufälligkeiten die Rede ist oder nicht.

Von den eingetrockneten und gewogenen Proben wurden einige benutzt um zu bestimmen, wieviel löslichen Proteinstickstoff der Eintrocknungsrest enthielt, während ein wässriger Auszug anderer Proben zu Krystallisationsversuchen gebraucht wurde, um dadurch Aufklärungen darüber zu erhalten, inwieweit das Eialbumin durch die Vorbehandlung und die nachfolgende Eintrocknung einige Veränderungen erlitten habe.

Tabelle 35.

Eintrocknen von Eialbuminlösung.

(100 g Eialbuminlösung enthielten 0,7825 g Proteinstickstoff und 0,099 g Ammoniumsulfat).

Ver- suchs- num- mer	Vor- behandlung	Die abge- wogene Eier- albuminlösung		100 g Eialbumin- lösung enthalten deshalb		Faktor, Eieralbu- min- trocken- substanz mit Eieral- bumin- stickstoff- dividiert	Die 100 g Eier- albuminlösung entsprechende Menge Trocken- substanz enthielt von löslichem Proteinstickstoff		Be- merkung
		wog g	enthält Trocken- substanz g	Trock- Sub- stanz g	Eieralbu- min- trocken- substanz (Trocken- substanz ÷ 0,099 g) g		in g	in % der ursprgl. Menge löslich. Protein- stickst.	
1	keine	20,236	1,0303	5,091	4,992	6,38 ₀	—	—	Angewandt z. Krystallis.
2	›	20,252	1,0306	5,089	4,990	6,37 ₇	0,7032	89,87	
3	›	10,096	0,5147	5,098	4,999	6,38 ₀	0,6925	88,50	
4	›	10,101	0,5142	5,091	4,992	6,38 ₀	—	—	
5	5 Stunden bei 55—60°	20,268	1,0346	5,105	5,006	6,39 ₇	—	—	›
6	›	20,264	1,0342	5,104	5,005	6,39 ₆	0,5863	74,93	
7	›	10,144	0,5190	5,116	5,017	6,41 ₂	0,5144	65,74	
8	›	10,142	0,5184	5,111	5,012	6,40 ₆	—	—	
9	¾ Stunden bei 93—97°	20,085	1,0255	5,106	5,007	6,39 ₀	—	—	›
10	›	20,121	1,0248	5,093	4,994	6,38 ₂	nichts	0,00	
11	›	10,092	0,5146	5,099	5,000	6,39 ₀	nichts	0,00	
12	›	10,095	0,5151	5,103	5,004	6,39 ₆	—	—	

Mittel: 6,39₂

Der vorletzte senkrechte Stab der Tabelle 35 zeigt, daß in den Proben Nr. 2 und 3 bis 90% des Proteinstickstoffs noch in löslicher Form vorhanden sind. Die Eintrocknung bei Zimmertemperatur ohne Vorbehandlung hat somit nur eine geringfügige Denaturierung zur Folge gehabt. Weit mehr des Albumins ist durch die Vorbehandlung bei 55—60° (Nr. 6 und 7) denaturiert worden, und die Vorbehandlung bei 93 bis 97° hat eine vollständige Denaturierung bewirkt.

Ein damit völlig im Einklang stehendes Resultat gaben die Krystallisationsversuche, bei welchen der betreffende Eintrocknungsrückstand mit 20 ccm Wasser sorgfältig behandelt wurde; die abfiltrierte Lösung wurde mit so viel gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, daß ein bleibender Niederschlag eben entstand, wonach die Flüssigkeit wieder filtriert, und das Filtrat geimpft und nach gutem Umrühren zur Krystallisation beiseite gestellt wurde.

Während die Lösung des Eintrocknungsrückstands vom Versuch Nr. 9, wie es zu erwarten war, durch Zusatz vom Ammoniumsulfat keinen Niederschlag gab, so fingen die den Versuchen Nr. 1 und 5 entsprechenden Lösungen bald zu krystallisieren an, und der gebildete Niederschlag hatte unter dem Mikroskop das gewöhnliche charakteristische Aussehen: kleine zu Bündeln und Garben vereinigte Nadeln. Nach 4-tägiger Krystallisation wurde filtriert, und das Filtrat analysiert. Es zeigte sich dann, daß die den Versuchen Nr. 1 und 5 entsprechenden Filtrate auf 100 g Wasser beziehungsweise 0,430 g und 0,578 g Eihydrat enthielten, während in der in einer früheren Abhandlung¹⁾ angegebenen Weise geschätzt werden konnte, daß reine Eieralbuminlösungen durch Krystallisation unter den vorliegenden Umständen (Ammoniumsulfat- und Wasserstoffionenkonzentration) Filtrate mit beziehungsweise ca. 0,270 g und 0,240 g Eihydrat auf 100 g Wasser geben würden. Wenn auch demgemäß — wie eine einfache Rechnung lehrt — weit der größte Teil des Eieralbumins auskrystallisiert ist sowohl in Nr. 1 als auch in Nr. 5, so enthält

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 27 (1918).

doch in beiden Fällen das Filtrat mehr Eihydrat als normal, und es ist unverkennbar, daß die Krystallisation in Nr. 1 vollständiger als in Nr. 5 gewesen ist.

Wir bemerken nur, daß das Ergebnis dieser Krystallisationsversuche andeuten konnte, daß vor der Denaturierung des Eieralbumins eine Umbildung in nicht krystallisierbares Eieralbumin stattfindet, das Versuchsmaterial ist aber zu klein, um sichere Folgerungen zu erlauben; wir kehren indessen in einer späteren Arbeit über die Denaturierung des Eieralbumins zu dieser Frage zurück.

Das Ergebnis dieser Eintrocknungsversuche meinen wir folgendermaßen ausdrücken zu können: Derjenige Faktor, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffs zu multiplizieren ist, um das Gewicht des über festem Kaliumhydroxyd im Vakuum bei Zimmertemperatur getrockneten Eieralbumins zu geben, ist sehr nahe 6,4, und dies gilt nicht nur für das lösliche krystallisierbare Eieralbumin, sondern auch für das denaturierte sowie für eventuelle Zwischenglieder zwischen diesen beiden Stoffen.

Der gefundene Faktor stimmt ziemlich gut mit dem, was frühere Forscher durch Analysen denaturierten und sodann getrockneten Eieralbumins finden, überein. So finden Thomas B. Osborne und George F. Campbell¹⁾ in Analysen von 6 sorgfältig gereinigten, danach denaturierten und schließlich bei 110° getrockneten Proben von Eieralbumin einen Gehalt von 15,32–15,60% Stickstoff; der Mittelwert war 15,51%, was dem Faktor 6,45 entspricht. Ganz ähnliche Resultate bringen die übrigen veröffentlichten Analysen sorgfältig gereinigten Materials.

Mit Benutzung des Faktors 6,40 nebst dem oben (S. 223) für krystallisiertes Eieralbumin gefundenen Faktor, 7,86, findet man den Wassergehalt der Krystalle pr. 1 g wasserfreies Eieralbumin von folgender Größe:

$$\frac{7,86 \div 6,40}{6,40} = 0,228 \text{ g.}$$

¹⁾ Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 22, S. 440 (1900).

während der Faktor 6,45 in analoger Weise 0,219 g geben wird. Das krystallisierte Eieralbumin enthält also auf jedes Gramm wasserfreies Albumin ca. 0,22 g Wasser.

B. Enthält krystallisiertes Eieralbumin einen Überschuß an Schwefelsäure oder Ammoniak?

In der vorhergehenden Abhandlung¹⁾ ist es beschrieben, wie man mittels einer Wasserstoffionenmessung einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung den Überschuß an Schwefelsäure oder Ammoniak bestimmen kann, wenn die Zusammensetzung der Lösung übrigens bekannt ist. Es würde deshalb auch verhältnismäßig leicht sein, die obenstehende Frage, welche Gegenstand dieses Abschnitts ist, zu beantworten, wenn die Krystalle in reinem Zustand ohne anhaftende Mutterlauge vorlägen, oder wenn man von dem Überschuß letzterer an Schwefelsäure oder Ammoniak absehen könnte. Dann brauchte man nur die Krystalle in Wasser zu lösen und den Gehalt der wässerigen Lösung an Ammoniak- und Proteinstickstoff nebst der Wasserstoffionenkonzentration derselben zu ermitteln, um aus den erhaltenen Resultaten den Überschuß an Schwefelsäure oder Ammoniak berechnen zu können. In der Tat gibt ein solches Verfahren auch ein sehr angenähert richtiges Resultat, indem der Überschuß der Mutterlauge an Schwefelsäure oder Ammoniak gewöhnlich nur einen kleinen Bruchteil der in den Krystallen vorhandenen Menge ausmacht, ein ganz richtiges Resultat erhält man natürlich aber nur unter Rücksichtnahme sowohl auf die Krystalle als auch auf die Mutterlauge. Das Verfahren wird dadurch etwas umständlicher, gibt aber übrigens zu keinerlei Schwierigkeiten Anlaß; es verlangt nur einige Wasserstoffionenmessungen nebst Analysen sowohl des Filtrats als auch der Krystalle mit anhaftender Mutterlauge, ganz wie es im Abschnitt A gelegentlich der Bestimmung des Faktors r besprochen wurde (siehe S. 211). Mittels derartiger Analysen und Wasserstoffionenmessungen kann nämlich der Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure oder

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 104 (1918).

überschüssigem Ammoniak, sowohl der des Filtrats als auch der der Krystalle mit anhaftender Mutterlauge ermittelt werden. Da wir weiter, wie es im vorigen Abschnitt (siehe S. 226) ausführlich erwähnt wurde, voraussetzen dürfen, daß alles im Niederschlage mit anhaftender Mutterlauge gefundene Ammoniumsulfat von der anhaftenden Mutterlauge herrührt, so kann die Menge dieser letzteren und ihr Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure oder überschüssigem Ammoniak berechnet werden (siehe S. 233), eine einfache Subtraktion gibt danach die überschüssige Menge Schwefelsäure oder Ammoniak, welche die von der Mutterlauge befreiten Krystalle enthalten. Zur näheren Erläuterung des Verfahrens werden wir die Einzelheiten, ein paar Versuche betreffend, anführen.

Als erstes Beispiel benutzen wir den in der Tabelle 33 angeführten Versuch (Nr. 8 der Tabelle 34).

Analyse des Filtrats: Da 50 ccm 56,359 g wägen, und 100 g Filtrat 4,6966 g Ammoniakstickstoff (a_f) und 0,0235 g Proteinstickstoff (p_f) enthalten, so werden 100 ccm Filtrat 112,718 g wägen und 5,2939 g Ammoniakstickstoff ($c = 3,78 n$)¹⁾ und 0,0265 g Proteinstickstoff (1,89 Milligrammäquivalenten = e) enthalten. Die Wasserstoffionenmessung gab $h = 11,27 \cdot 10^{-6}$.

Mittels der Kurven, Figur 14.²⁾ welche für die Ammoniumsulfatkonzentration $c = 2,79$ gelten, erhält man jetzt, daß für $e = 1,89$ und $h = 11,27 \cdot 10^{-6}$ $q = + 2,0$ sein wird, indem q die Anzahl Kubikzentimeter $n/1000$ Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (÷) in Überschuß pr. Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff angibt. Aus Figur 15 (l. c.), deren Kurven für die Ammoniumsulfatkonzentration $c = 4,12$ gelten, ergibt sich in derselben Weise, daß bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration q gleich + 5,0 wird, wenn $e = 1,89$ und $h = 11,27 \cdot 10^{-6}$ ist. Da somit

$$\begin{array}{l} c = 2,79 \quad q = + 2,0 \text{ gibt} \\ \text{und } c = 4,12 \quad q = + 5,0 \quad \cdot \end{array}$$

so bekommt man bei Interpolation, daß für $c = 3,78$, die Ammoniumsulfatkonzentration des Filtrats, q gleich + 4,2 wird. Der Überschuß an Schwefelsäure ist also + 4,2 · 1,89 = + 7,94 ccm $n/1000$ in 100 ccm Filtrat und + 7,94 : 1,12718 = + 7,04 ccm $n/1000$ in 100 g Filtrat.

¹⁾ Bei der Berechnung der Äquivalent-Konzentration, c , des Ammoniumsulfats ist hier wie in den folgenden Beispielen keine Rücksicht auf das Volumen des Eihydrats genommen, weil die betreffende Korrektur, bei den schwachen Proteinkonzentrationen, wovon in diesen Versuchen die Rede ist, mit den Versuchsfehlern verglichen, belanglos ist.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 189 (1918).

Analyse des Niederschlags mit anhaftender Mutterlauge (N + M), Probe I: Da 100 g (N + M) zufolge der Analyse 3,7563 g Ammoniakstickstoff (a_p) und 2,5834 g Proteinstickstoff (p_p) enthalten, so wird die abgewogene Probe I (Gewicht: 11,4526 g) und die daraus dargestellte Lösung (100 ccm) 0,4302 g Ammoniakstickstoff ($c = 0,31$ n) und 0,2959 g Proteinstickstoff (21,12 Milligramm-Äquivalent = e) enthalten. Die Wasserstoffionenmessung gab $h = 14,61 \cdot 10^{-6}$.

Da nun sowohl die Kurven der Figur 12 ($c = 0,363$ n) als auch die Kurven der Figur 13 ($c = 0,062$ n) für $e = 21,12$ und $h = 14,61 \times 10^{-6}$ $q = \div 0,5$ geben, so kann q auch für den zwischenliegenden Wert von c (0,31 n), der hier in Rede steht, gleich $\div 0,5$ gesetzt werden. Die gesamte überschüssige Menge Schwefelsäure der Probe I ist deshalb $\div 0,5 \cdot 21,12 = \div 10,56$ ccm $n/1000$ (d. h. 10,56 ccm $n/1000$ Ammoniak).

Vorausgesetzt, daß die ganze Menge Ammoniakstickstoff (0,4302 g), die in Probe I gefunden wurde, von Ammoniumsulfat in anhaftender Mutterlauge herrührt,¹⁾ wird das Gewicht letzterer $\frac{100 \cdot 0,4302}{4,6966} = 9,1598$ g²⁾ sein, worin 0,0022 g Proteinstickstoff (0,16 Milligramm-Äquivalenten), während die überschüssige Schwefelsäure laut der obenstehenden Analyse des Filtrats $+ 7,04 \cdot \frac{9,1598}{100} = + 0,64$ ccm $n/1000$ ausmacht.

Da (N + M) demgemäß in Probe I in allem $\div 10,56$ ccm $n/1000$ und M für sich allein $+ 0,64$ ccm überschüssige Schwefelsäure enthält, so wird N (der Niederschlag) $: 10,56 \div (+ 0,64) = : 11,20$ ccm $n/1000$ überschüssiger Schwefelsäure oder pr. Milligramm-Äquivalent $\frac{\div 11,20}{21,12 \div 0,16} = \div 0,53$ ccm enthalten.

Das Resultat wird also, daß die Krystalle in diesem Versuche 0,53 ccm $n/1000$ überschüssigen Ammoniak pr. Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff enthalten haben.

Als zweites Beispiel wählen wir Versuch Nr. 14 Tabelle 34, wo das Auskrystallisieren in einer etwas saureren Flüssigkeit stattgefunden hatte, weshalb die Berechnung sich ein wenig anders formt:

¹⁾ Bei dieser Berechnung ist es natürlich erlaubt, von derjenigen kleinen Menge Ammoniak abzusehen, welche das Endresultat als Bestandteil der Krystalle aufweist, indem die ihr entsprechende Menge Stickstoff nur einen verschwindenden Bruchteil der ganzen gegenwärtigen Ammoniakstickstoffmenge ausmacht (in diesem Versuche z. B. nur etwa $\frac{1}{2700}$).

²⁾ Das Gewicht der Krystalle wird demnach $11,4526 \div 9,1598 = 2,2928$ g sein, und da der Proteinstickstoff der Krystalle $0,2959 \div 0,0022 = 0,2937$ g ausmacht, so wird der Proteinfaktor $r = \frac{2,2928}{0,2937} = 7,807$ werden (vgl. Tabelle 33).

Analyse des Filtrats: 100 ccm Filtrat wogen 112,013 g und enthielten 4,9221 g Ammoniakstickstoff ($c = 3,51$ n) und 0,0617 g Proteinstickstoff (4,40 Milligramm-Äquivalente = e). Die Wasserstoffionenmessung gab $h = 38,28 \cdot 10^{-6}$.

Aus den Kurven der Figur 10¹⁾ erhellt es jetzt, daß b, welches die pr. Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff gebundene Menge überschüssige Schwefelsäure in ccm $n/1000$ bedeutet, für $h = 38,28$ in folgender Weise mit der Ammoniumsulfatkonzentration variiert:

$$c = 0,062; \quad b = + 11,30$$

$$c = 0,363; \quad b = + 13,00$$

$$c = 1,417; \quad b = + 13,45$$

$$c = 2,817; \quad b = + 14,45$$

Aus diesen Werten bekommt man durch graphische Extrapolation für $c = 3,51$, $b = + 15,00$.²⁾

Die ganze am Eihydrat in 100 ccm Filtrat gebundene Menge überschüssiger Schwefelsäure ist somit $+ 15 \cdot 4,40 = + 66,0$ ccm $n/1000$.

Weiter läßt sich die Konzentration, s, der überschüssigen Schwefelsäure im Dispersionsmittel durch Anwendung der Formel³⁾:

$$s = h \cdot f_s \div \frac{(x_{\max})^2}{h \cdot f_s} \text{ berechnen, welche Berechnung } s = 486 \cdot 10^{-6}$$

gibt, woraus man wieder bekommt, daß die in 100 ccm Filtrat gegenwärtige, nicht an Eihydrat gebundene, überschüssige Menge Schwefelsäure 48,6 ccm $n/1000$ ist, indem auch hier, wie oben, vom Volumen des Eihydrats abgesehen ist (siehe S. 232).

Die Gesamtmenge überschüssiger Schwefelsäure in 100 ccm Filtrat wird deshalb: $+ 66,0 + 48,6 = + 114,6$ ccm $n/1000$ und in 100 g Filtrat $+ 114,6 : 1,12013 = + 102,31$ ccm.

Analyse des Niederschlags mit anhaftender Mutterlauge, (N + M), Probe I: Da 100 g (N + M) laut der Analyse 3,4264 g Ammoniakstickstoff (a) und 2,7959 g Proteinstickstoff (p_b) enthalten, so wird die abgewogene Probe (Gewicht 6,5141 g) und die daraus dargestellte Lösung (100 ccm) 0,2232 g Ammoniakstickstoff ($c = 0,159$ n) und

¹⁾ Diese Zeitschrift,

²⁾ Dieser Wert von b kann, weil er durch Extrapolation gefunden ist, natürlich nicht besonders genau sein, was wieder bedingt, daß der Gehalt des Filtrats an überschüssiger Schwefelsäure auch nicht besonders genau bestimmt ist. Das bedeutet indessen nur wenig, weil — wie aus dem folgenden (siehe S. 235) sich ergibt — die aus der anhaftenden Mutterlauge stammende, überschüssige Schwefelsäure nur etwa $1/36$ der gesamten im Niederschlage mit anhaftender Mutterlauge gegenwärtigen Menge überschüssige Schwefelsäure ausmacht.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 114 (1918).

0,1821 g Proteinstickstoff (13,00 Milligramm-Äquivalente = e) enthalten. Die Wasserstoffionemessung hat $h = 40,36 \cdot 10^{-6}$ gegeben.

Auf den Kurven Figur 10 (l. c.) ist zu ersehen, daß, wenn $h = 40,36$ ist, so wird für

$$c = 0,062; \quad b = + 12,02$$

$$c = 0,363; \quad b = + 13,85$$

$$c = 1,417; \quad b = + 14,35$$

$$e = 2,817; \quad b = + 15,45$$

sein.

Aus diesen Werten erhält man durch graphisches Interpolieren $b = + 13,38$ für $c = 0,159$.

Die 100 ccm Lösung werden somit in allem $+ 13,38 \cdot 13,00 = + 173,94$ ccm $n/1000$ überschüssige an Eihydrat gebundene Schwefelsäure enthalten.

Weiter berechnet man mittels der Formel

$$s = h \cdot f_s \div \frac{(x_{\max})^2}{h \cdot f_s},$$

daß die 100 ccm Lösung der Probe I von nicht an Eihydrat gebundene überschüssige Schwefelsäure 12,85 ccm $n/1000$ enthalten.

Schließlich bekommt man in derselben Weise und unter derselben Voraussetzung wie im ersten Beispiel, daß das Gewicht der die Krystalle anhaftenden Mutterlauge

$$\frac{100 \cdot 0,2232}{4,3942} = 5,0794 \text{ g } ^1) \text{ ausmacht, worin } 0,0028 \text{ Proteinstickstoff}$$

(0,20 Milligramm-Äquivalente), während die überschüssige Schwefelsäure laut der obenstehenden Analyse

$$+ 102,31 \times \frac{5,0794}{100} = + 5,20 \text{ ccm } n/1000 \text{ beträgt.}$$

Da demnach (N + M) in Probe I in allem $+ 173,94 + 12,85 = + 186,79$ ccm $n/1000$ überschüssige Schwefelsäure enthält, und da M für sich allein $+ 5,20$ ccm enthält, so wird $N = 186,79 \div 5,20 = + 181,59$ ccm

¹⁾ Das Gewicht der Krystalle wird demzufolge $6,5141 \div 5,0794 = 1,4347$ g sein, und da der Proteinstickstoff der Krystalle $0,1821 \div 0,0028 = 0,1793$ g ausmacht, so wird der Proteinfaktor $r, \frac{1,4347}{0,1793} = 8,002$ werden

(vgl. Tabelle 34). Dieser Wert von r entspricht indessen nicht nur dem Wassergehalt der Krystalle, sondern umfaßt zugleich den Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure. Da nun letzterer (siehe S. 236) 14,19 ccm $n/1000$ (= 0,696 mg Schwefelsäure) pr. Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff (= 14,01 mg Stickstoff) ausmacht, so wird der dementsprechende Faktor

$$\frac{0,696}{14,01} = 0,050 \text{ sein; der korrigierte Wert von r wird deshalb } 8,00, \div 0,05_0 = 7,95_2.$$

$n/1000$ überschüssige Schwefelsäure oder pr. Milligramm-Äquivalent Proteinstoff $\frac{+ 181,59}{13,00 \div 0,20} = + 14,19$ ccm enthalten.

Das Resultat wird somit, daß die Krystalle in diesem Versuche 14,19 ccm $n/1000$ überschüssige Schwefelsäure pr. Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff enthalten haben.

Auf einem der beiden Wege, welche bei den oben ausführlich besprochenen Beispielen befolgt wurden, haben wir den Gehalt der Krystalle an überschüssiger Schwefelsäure oder überschüssigem Ammoniak in allen in der Tabelle 34 mitgeteilten Versuchen berechnet, ebenso wie in ein paar anderen dafür geeigneten Versuchen, bei welchen das analytische Verfahren indessen nicht hinlänglich genau war, um den Faktor r aus den Ergebnissen zu berechnen. Die Resultate dieser Berechnungen sind in der Tabelle 36 zusammengestellt worden.

Die ersten 14 Versuchsnummern entsprechen denselben Nummern der Tabelle 34. Der zweite, dritte und vierte Stab der Tabelle enthalten Erläuterungen über die Zusammensetzung und Wasserstoffionenkonzentration des Filtrats, während die vier letzten Stäbe den für die Krystalle berechneten Gehalt an Schwefelsäure oder Ammoniak im Überschuß enthalten. Die Figur 17 gibt diese Resultate in graphischer Form wieder, indem die Wasserstoffionenkonzentration, h , als Abszisse und der Wert von m (letzter Stab der Tabelle 36) als Ordinate fungieren.

Durch die solchermaßen festgelegten Punkte ist eine Kurve gezeichnet, welche demnach die Abhängigkeit des Gehalts der ausgeschiedenen Krystalle an Überschuß von Schwefelsäure oder Ammoniak von der Wasserstoffionenkonzentration der Mutterlauge (des Filtrats) versinnlicht. Es ist zwar höchst wahrscheinlich, daß auch andere Faktoren als die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrats, z. B. die Ammoniumsulfatkonzentration desselben in der hier erwähnten Beziehung von Bedeutung sind, es geht aber aus den Versuchsergebnissen deutlich hervor, daß die Wasserstoffionenkonzentration weit der wichtigste Faktor ist, und wir haben es deshalb nicht in Bedacht gezogen, alle Versuchsergebnisse durch eine gemeinsame Kurve wiederzugeben.

Tabelle 36.

Der Gehalt der Krystalle an Schwefelsäure oder Ammoniak in Überschuß.

Ver- suchs- num- mer	des Filtrats			Die Krystalle enthalten m ccm $n/1000$ Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (-) in Überschuß pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff			
	Gehalt an Protein- stickstoff in Milligr.- Äquival., e, in 100 ccm	Ammo- niumsul- fat-Äqui- valent- konzent- ration, c	Wasser- stoffionen- konzent- ration, h	Probe I	Probe II	Probe III	Mittel von
	e	c	$h \times 10^6$	m	m	m	m
1	18,32	3,78	15,13	+ 0,44	+ 1,20	+ 1,11	+ 0,92
2	2,54	3,77	11,02	÷ 1,44	÷ 1,08	÷ 1,01	÷ 1,18
3	1,22	3,90	11,13	÷ 1,63	÷ 1,54	÷ 1,59	÷ 1,59
4	1,30	3,90	12,06	÷ 1,34	÷ 1,54	÷ 1,46	÷ 1,45
5	4,52	3,74	11,37	÷ 0,51	÷ 0,61	÷ 0,72	÷ 0,61
6	2,74	3,73	12,15	÷ 1,00	÷ 1,22	÷ 1,39	÷ 1,20
7	3,03	3,83	12,46	÷ 0,78	÷ 0,54	÷ 0,79	÷ 0,70
8	1,89	3,78	11,27	÷ 0,53	+ 0,15	÷ 0,43	÷ 0,27
9	2,76	3,76	12,04	÷ 0,03	÷ 0,13	÷ 0,23	÷ 0,13
10	32,47	3,22	10,00	÷ 4,76	÷ 4,75	÷ 4,76	÷ 4,76
11	8,77	3,52	9,73	÷ 6,53	÷ 6,56	÷ 6,51	÷ 6,53
12	0,33	4,43	8,29	÷ 10,22	÷ 10,36	—	÷ 10,29
13	9,91	3,49	10,57	÷ 2,78	÷ 2,79	÷ 2,78	÷ 2,78
14	4,40	3,51	38,28	+ 14,19	+ 14,25	+ 14,14	+ 14,19
15	1,18	3,89	11,85	÷ 1,53	÷ 1,44	÷ 1,77	÷ 1,58
16	1,63	3,88	11,45	÷ 1,69	÷ 0,96	÷ 1,25	÷ 1,30
17	4,21	3,48	27,29	+ 8,63	+ 8,59	+ 8,59	+ 8,60
18	6,10	3,49	17,34	+ 2,66	+ 2,68	+ 2,63	+ 2,66

Aus Figur 17 geht hervor, daß nur, wenn die Mutterlauge eine Wasserstoffionenkonzentration von etwa 13×10^{-6} besitzt, die ausgeschiedenen Eieralbuminkrystalle weder Schwefelsäure noch Ammoniak in Überschuß enthalten werden. Bei höheren Wasser-

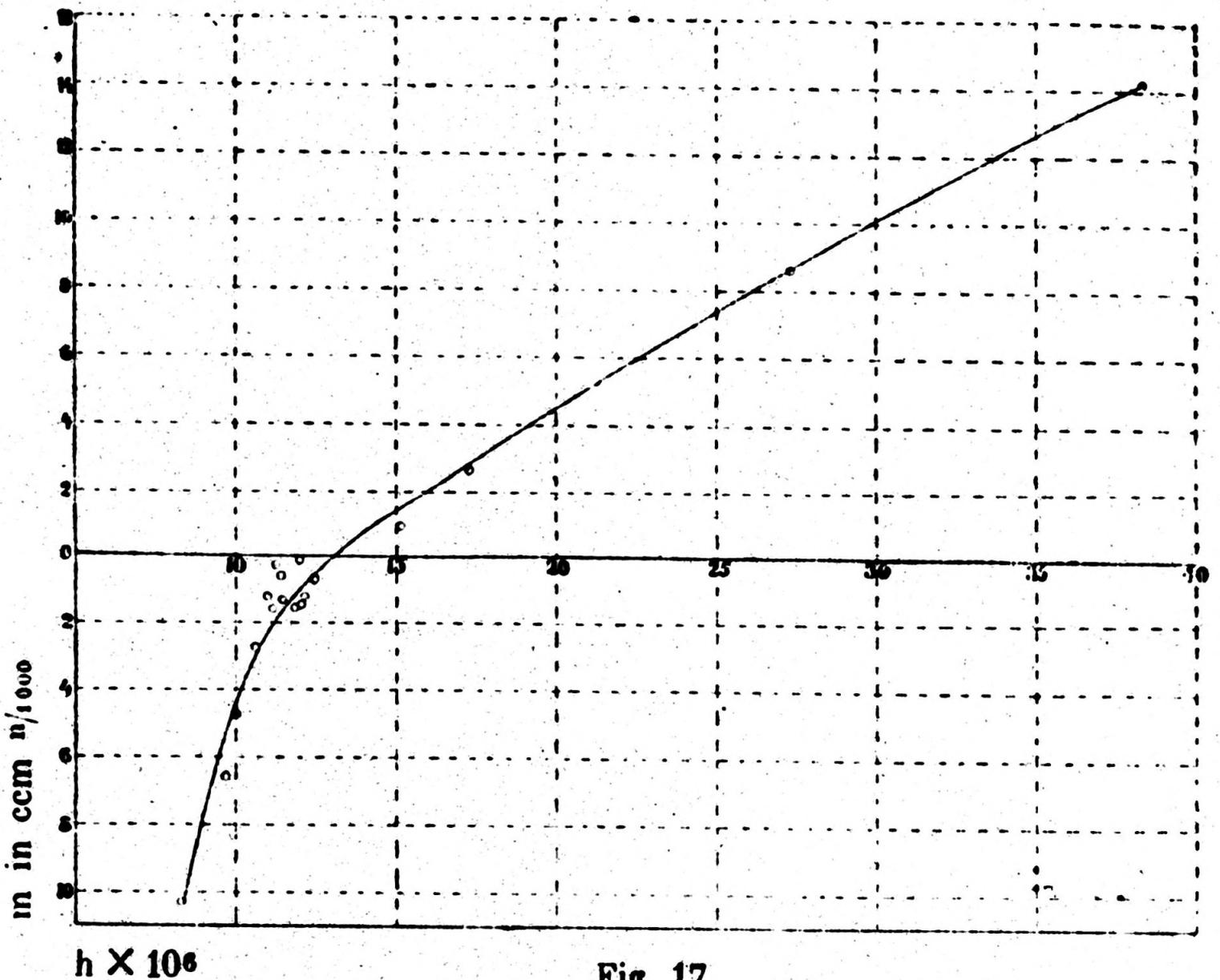


Fig. 17.

stoffionenkonzentrationen als $ca. 13 \times 10^{-6}$ werden die Krystalle Schwefelsäure, und bei niedrigeren Ammoniak enthalten und um so mehr von diesen Stoffen, je höher beziehungsweise je niedriger die Wasserstoffionenkonzentration ist.

Vergleicht man die Kurve der Figur 17 mit denjenigen der Figur 10, so sieht man beim ersten Blick, daß man es in beiden Fällen mit Kurven von ungefähr derselben Form zu tun hat. Da nun die Kurven der Figur 10 die Abhängigkeit zwischen der Wasserstoffionenkonzentration einerseits und der vom gelösten Eihydrat gebundenen überschüssigen Menge Schwefelsäure oder Ammoniak andererseits versinnlichen, während die Kurve der Figur 17 die Abhängigkeit der durch das auskrystallisierte Eieralbumin gebundenen überschüssigen Menge Schwefelsäure oder Ammoniak von der Wasserstoffionenkonzentration zeigt, so liegt die Folgerung nahe, daß das Auskrystallisieren nur bedeutet, daß die disperse Phase sich in fester Form ausscheidet mit derselben Zusammensetzung oder

jedenfalls mit demselben Gehalt an Schwefelsäure oder Ammoniak in Überschuß, wie sie schon in der Lösung besitzt, und zwar ist diese Folgerung auch im großen und ganzen richtig, ein näherer Vergleich der betreffenden Kurven zeigt aber doch, daß die Sachlage nicht ganz so einfach ist.

In der Tabelle 37 haben wir die einer Reihe Werten von h entsprechenden Werte sowohl von m (an Figur 17 abgelesen) als von b (zum Teil direkt an Figur 10, Kurve IV, $c = 2,817 n$ entsprechend, abgelesen, zum Teil, für $c = 3,7 - 3,8 n$, durch graphisches Extrapolieren mittels Figur 10 geschätzt) zusammengestellt.

Tabelle 37.

Wasserstoffionen- konzentration, h , der Mutterlauge oder der Lösung	Die überschüssige von einem Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff gebundene Menge Schwefelsäure (+) oder Ammoniak (÷) in ccm $n/1000$		
	in den Krystallen m (Figur 17)	in der dispersen Phase einer ammoniumsulfathaltigen Eier- albuminlösung	
		b (Figur 10, Kurve IV; $c = 2,817$)	b (Figur 10. Extra- polation; $c = 3,7 - 3,8$)
$h \times 10^6$			
10	÷ 4,5	÷ 6,0	÷ 6,3
13,1	0	÷ 2,6	÷ 2,7
15	+ 1,4	÷ 0,6	÷ 0,65
15,6	+ 1,8	0	0
20	+ 4,5	+ 3,8	+ 4,0
25	+ 7,4	+ 7,5	+ 7,95
30	+ 10,1	+ 10,6	+ 11,1
35	+ 12,6	+ 13,1	+ 13,7

Da die durchschnittliche Ammoniumsulfatkonzentration, c , der Mutterlauge von den in der Tabelle 36 zusammengestellten Krystallisationen $3,7 - 3,8 n$ ist, so wird es von besonderem

Interesse sein, die für diese Ammoniumsulfatkonzentration gefundenen Werte von b (Tabelle 37, letzter senkrechter Stab) mit den entsprechenden von m (Tabelle 37, zweiter Stab) zu vergleichen. Bei einem solchen Vergleich muß man sich indessen wohl erinnern, daß die Werte des b , mit Vorzeichen gerechnet — wie es in der vorhergehenden Abhandlung¹⁾ ausführlich dargetan ist — immer zu niedrig sind, und daß der Fehler desto größer ist, je mehr b sich 0 nähert. Die im letzten Stab der Tabelle 37 aufgeführten Zahlengrößen sind deshalb mit einer Korrektur zu versehen, die immer positiv ist, und am größten in der Nähe von 0. Dieses stimmt auch damit überein, daß das Eieralbumin wie jeder Ampholyt bei isoelektrischer Reaktion Säure gebunden hat²⁾ derart, daß das korrigierte b für $h = 15-16 \times 10^{-6}$ positiv sein muß. Wird eine solche Korrektur an b im letzten Stab der Tabelle 37 angebracht, so ersieht man, daß der Nullpunkt in der Reihe aufwärts rückt, sodaß er bei einer ähnlichen Wasserstoffionenkonzentration wie m fallen wird, während die numerischen Werte des b auf beiden Seiten des Nullpunkts, etwa 13×10^{-6} , höher sind als die entsprechenden Werte des m .

Wir können jetzt dem oben erwähnten Satz eine erschöpfendere Form geben: Bei einer Wasserstoffionenkonzentration von ca. 13×10^{-6} wird das Eihydrat in der Lösung vor der Krystallisation weder Schwefelsäure noch Ammoniak in Überschuß enthalten, und dasselbe wird mit den bei dieser Wasserstoffionenkonzentration ausgeschiedenen Krystallen der Fall sein. Etwas anders liegt die Sache, wenn die Wasserstoffionenkonzentration wesentlich höher oder niedriger als etwa 13×10^{-6} ist, indem die bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeschiedenen Krystalle ein bißchen weniger überschüssige Schwefelsäure als das Eihydrat vor dem Krystallisieren enthalten, während die bei niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeschiedenen Krystalle ein

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 104 (1918).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 104, Abschn. B, C, D (1918).

bißchen weniger überschüssiges Ammoniak enthalten, als das Eihydrat vor der Krystallisation.

Im großen und ganzen muß man indessen damit rechnen, daß das Eihydrat mit weit dem wesentlichsten Teil des Überschusses an Schwefelsäure oder Ammoniak, welchen es vor der Krystallisation enthält, auskrystallisiert,¹⁾ und daher kommt es, daß Hopkins' und Pinkus' auch von uns angewandte Verfahren²⁾ zur Darstellung krystallisierten Eialbumins Produkte gibt, welche selbst nach wiederholten Umkrystallisationen wechselnde Mengen von Schwefelsäure oder Ammoniak enthalten. Es muß nämlich gewissermaßen geschätzt werden, wieviel Schwefelsäure bei der ersten Krystallisation zugesetzt werden muß, aber hieraus folgt wieder, daß die Wasserstoffionenkonzentration und damit die vom Eihydrat gebundene Menge von Schwefelsäure oder Ammoniak in Überschuß nicht immer bei der ersten Krystallisation des Eihydrats dieselbe

¹⁾ In gutem Einklang damit findet man auch, daß die Wasserstoffionenkonzentration sich während der Krystallisation nur wenig ändert. Wir haben der Untersuchung dieser Frage eine Reihe von Versuchen gewidmet, bei welchen wir die Eialbuminlösung mit angemessenen Mengen von Schwefelsäure oder Ammoniak und danach mit Ammoniumsulfat bis zur bleibenden Unklarheit versetzt haben. Sodann haben wir filtriert und das klare Filtrat mit einem Tropfen Impfungsmaterial versetzt, wonächst wir die Lösung in das Elektrodengefäß gebracht und die Wasserstoffionenkonzentration sowohl sofort als auch zu wiederholten Malen während des Krystallisierens gemessen haben. Als Beispiele der Versuchsergebnisse können angeführt werden:

$h \times 10^6$	
sofort	nach reichlicher Krystallisation
43,7	43,3
28,2	27,7
19,9	18,3
16,2	14,4
8,9	6,9
4,0	2,9.

Die Zahlen zeigen, daß die Wasserstoffionenkonzentration während der Krystallisation ein wenig kleiner wird, und diese Abnahme ist, — wie nach dem oben angeführten zu erwarten war — verhältnismäßig am größten bei den kleineren Wasserstoffionenkonzentrationen.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 15 (1918).

ist. Da nun Eihydratkrystalle mit z. B. viel überschüssiger Schwefelsäure eine Lösung mit großer Wasserstoffionenkonzentration geben werden, aus welcher das Eihydrat sich bei der Umkrystallisation wieder mit einem reichlichen Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure ausscheidet, so ist leicht zu verstehen, daß selbst wiederholte Umkrystallisationen nur zum Teil die Verschiedenheiten auszugleichen vermögen, welche von den nicht immer identischen Bedingungen der ersten Krystallisation stammen.

Um dies näher zu beleuchten, werden wir nur ein paar ganz einfache Versuche mitteilen.

Bei den Versuchen Nr. 13, 14, 17 und 18 (Tabelle 34) wurden die nach der Probenahme zurückbleibenden Reste des Niederschlags mit einer Ammoniumsulfatlösung gewaschen, deren Konzentration in der gewöhnlichen Weise¹⁾ bestimmt wurde, und die keinen Überschuß weder von Schwefelsäure noch von Ammoniak enthielt. Danach wurden die Niederschläge jeder für sich in Wasser gelöst, und aus den Lösungen das Eihydrat wieder durch Zusatz von Ammoniumsulfat ausgeschieden. Nach einigen Tagen wurde filtriert, die Niederschläge gewaschen und gelöst und die Krystallisation zum drittenmal wiederholt. In den solchermaßen erhaltenen Mutterlaugen gab die Messung der Wasserstoffionenkonzentration die unten angeführten Resultate, welche des Vergleichs wegen mit der Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate von der ersten Krystallisation (s. Tabelle 34) zusammengestellt sind:

	$h \times 10^6$	
	Erste Mutterlauge.	Dritte Mutterlauge.
Nr. 13	10,57	10,38
18	17,34	15,71
17	27,29	24,16
14	38,28	31,77

Die Versuche mit den kleinen Konzentrationen der Wasserstoffionen zeigen somit keine oder nur eine kleine Verschiebung von der ersten zu der dritten Mutterlauge, wogegen die Versuche mit hoher Wasserstoffionenkonzentration eine deutliche Abnahme dieser von der ersten zu der dritten Krystallisation zeigen. Andererseits zeigen die Zahlen ebenso unverkennbar, daß die Krystalle des Versuchs 14 gewiß viele Male umkrystallisiert werden mußten, wenn es gelingen sollte, den großen Gehalt an überschüssiger Schwefelsäure auf diesem Wege zu beseitigen.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 57 u. f. (1918).

C. Enthält krystallisiertes Eialbumin Ammoniumsulfat?

Es ist schon in der Einleitung (s. S. 214) erwähnt, daß F. Gowland Hopkins¹⁾ eine gesättigte Lösung von Natriumchlorid in 1-prozentiger Essigsäure benutzt hat, um Eialbumin-krystalle von anhaftender Mutterlauge zu befreien, und daß es ihm durch ein solches vielmals wiederholtes Waschen gelungen ist, jede Spur von Schwefelsäure zu beseitigen, ohne daß die Krystalle dadurch ein anderes Aussehen zu bekommen schienen. Hopkins meint hieraus folgern zu können, daß die Krystalle wahrscheinlich nur aus Eialbumin bestehen und kein Ammoniumsulfat enthalten. Wir werden in diesem Abschnitt eine Reihe ähnlicher Versuche erwähnen, welche wir, um dieser Frage etwas näher zu treten, ausgeführt haben.

Als Versuchsmaterial dienten Eialbumin-krystalle, welche aus verdünnten Lösungen völlig gereinigten Eialbumins durch langsames Krystallisieren während 3—4 Wochen dargestellt waren, indem täglich kleine Mengen gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter gutem Rühren der Flüssigkeit zugefügt wurden. Diese langsame Krystallisation ermöglichte es, so große und wohlausgebildete Krystalle zu erhalten, daß eine durch das Waschen mit Kochsalzlösung hervorgerufene Änderung der Form oder des Aussehens unter dem Mikroskop leicht wahrgenommen werden konnte.

Zu den verschiedenen Versuchen wurde Material angewandt, welches bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen (von $8 \cdot 10^{-6}$ bis $28 \cdot 10^{-6}$ variierend) auskrystallisiert war. Wir erreichten dadurch, mit Material zu arbeiten, von dem wir, wie im vorigen Abschnitt nachgewiesen, wußten, daß es — davon abgesehen, ob Ammoniumsulfat darin einging oder nicht — überschüssiges Ammoniak enthielt, wenn es bei niedriger Wasserstoffionenkonzentration auskrystallisiert war, und überschüssige Schwefelsäure im entgegengesetzten Fall, während nur diejenigen Proben, welche bei etwa $13 \cdot 10^{-6}$ krystallisiert waren, weder das eine noch die andere enthielt.

¹⁾ Journal of Physiol., Bd. 25, S. 320 (1900).

Stellte es sich jetzt heraus, daß eine Probe Eieralbumin, die ohne Überschuß von Schwefelsäure oder Ammoniak auskrystallisiert war, beim Waschen nach Hopkins mit essigsaurer, gesättigter Natriumchloridlösung ein Produkt gab, welches wesentlich dasselbe Aussehen nach wie vor dem Auswaschen zeigte, und schwefelsäure- und ammoniakfrei war, dann ließ sich daraus nur die schon von Hopkins gezogene Folgerung ziehen, daß es sich wahrscheinlich nur um ein Wegwaschen von Mutterlauge handelte, nicht aber um ein Auswaschen eigentlicher Bestandteile der Krystalle. Es ist dies indessen, wie auch Hopkins bemerkt, nur eine wahrscheinliche und annehmbare Erklärung des Versuchsergebnisses, ein direkter Beweis der Richtigkeit dieser Erklärung liegt nicht vor.

Einen solchen Beweis für oder gegen dieselbe haben wir geglaubt dadurch erbringen zu können, daß wir zu gleicher Zeit Krystalle ohne und solche mit Überschuß von Schwefelsäure oder Ammoniak auswuschen. Wäre die Anschauung Hopkins' stichhaltig, und wäre es also möglich, die Mutterlauge völlig zu beseitigen, ohne die Zusammensetzung der Krystalle zu ändern, dann mußten auch Krystalle mit Überschuß an Schwefelsäure oder Ammoniak dieselbe Zusammensetzung nach dem Waschen wie vor demselben besitzen.

Die von uns gemachten Versuche haben jetzt das Resultat gegeben, daß sämtliche ausgewaschene Proben sich im wesentlichen gleich verhalten haben, ganz unangesehen, ob das untersuchte Material vor dem Waschen Überschuß von Schwefelsäure oder von Ammoniak enthalten hat oder nicht.

Unsere Versuchsergebnisse müssen deshalb dahin gedeutet werden, daß es nicht möglich ist, aus derartigen Auswaschversuchen sichere Folgerungen darüber zu ziehen, ob die Krystalle Ammoniumsulfat enthalten oder nicht. Zur näheren Erläuterung der Frage werden wir die Einzelheiten ein paar unserer diesbezüglichen Versuche mitteilen, aus welchen unter anderen auch die Größenordnung der Mengen, mit welchen wir gearbeitet haben, hervorgehen wird.

Versuch 8. Eine verdünnte Lösung von sechsmal umkrystallisiertem Eieralbumin wurde mit ein wenig verdünnter Schwefelsäure und

sodann — in täglichen Portionen à 5—10 ccm — mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Das dadurch im Laufe von vier Wochen bei Zimmertemperatur auskrystallisierte Eieralbumin wurde abfiltriert,¹⁾ wöchst der Niederschlag aus dem Filter genommen und in einer großen Schale mit 20—30 mal seines Volumens einer gesättigten Lösung von Natriumchlorid in 1-prozentiger Essigsäure übergossen wurde. In dieser Flüssigkeit wurde der Niederschlag so schnell und so vollständig wie möglich ausgerührt, dann wieder abfiltriert, und 8 mal mit der Natriumchloridlösung gewaschen. In der zuletzt durchgelaufenen Waschflüssigkeit ließ sich kein Sulfat mittels Baryumchlorid nachweisen. Der Niederschlag wurde dann aufs neue vom Filter genommen, in einer reichlichen Menge Natriumchloridlösung ausgerührt, wieder abfiltriert und 3 mal gewaschen, und dann nochmals vom Filter genommen in der Natriumchloridlösung ausgerührt, abfiltriert und 3 mal gewaschen.

Der in dieser Weise gewaschene Niederschlag wurde mit Wasser behandelt, wodurch ein Teil in Lösung ging, während ein anderer Teil, welcher offensichtlich denaturiert war oder während des Lösungsprozesses denaturiert wurde, ungelöst blieb. Die Lösung mit dem aufgeschlammten denaturierten Niederschlag wurde auf 500 ccm ergänzt, 2×100 ccm hiervon für die Schwefelsäurebestimmung, 2×100 ccm für die Ammoniakbestimmung und der Rest für die Bestimmung von Proteinstickstoff und Chlor verwendet. Die Absicht dieser letzten Bestimmung war, die gegenwärtige Menge der zum Waschen benutzten Kochsalzlösung zu ermitteln, indem dieselbe zwar schwefelsäurefrei war, aber einen ganz kleinen, bekannten Ammoniakgehalt besaß, welcher letztere bei der Bestimmung der Ammoniakmenge in den 2×100 ccm Lösung mit aufgeschlammtem Niederschlage mit in Rechnung gezogen werden mußte.

Die Bestimmung des Proteinstickstoffs ergab; daß 100 ccm Lösung mit aufgeschlammtem Niederschlage 841 mg oder ca. 60 Milligramm-Äquivalente Proteinstickstoff enthielten.

Die Schwefelsäurebestimmung wurde auf die in einer früheren Abhandlung²⁾ beschriebene Weise ausgeführt und ergab, daß in 100 ccm Lösung mit aufgeschlammtem Niederschlag Schwefelsäure nicht nachzuweisen war. Da man nun mittels dieser Probe eine Schwefelsäuremenge von 3 ccm $n/1000$ oder mehr (l. c. S. 40) nachzuweisen

¹⁾ Eine Analyse des Filtrats ergab, daß 100 ccm Filtrat 67,3 mg Proteinstickstoff und 4,830 g Ammoniakstickstoff enthielten, und daß — was hier von besonderem Interesse ist — die Wasserstoffionenkonzentration 24×10^{-6} betrug, $p_{H} = 4,62$ entsprechend. Das bei dieser Wasserstoffionenkonzentration auskrystallisierte Eieralbumin hat, wie es aus Fig. 17 (s. S. 238) hervorgeht, etwa 6,8 ccm $n/1000$ überschüssige Schwefelsäure pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff gebunden.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 39 (1918).

imstande ist, und da die zur Probe angewandte Menge Eieralbumin, die 60 Milligramm-Äquivalenten Proteinstickstoff entsprechen, vor dem Auswaschen mit der Kochsalzlösung — laut dem oben Angeführten (s. S. 245 Bemerkung unter dem Texte) — $60 \cdot 6,8 = 408$ ccm $n/1000$ überschüssige Schwefelsäure enthalten hat, so ist es außer Zweifel gestellt, daß die Krystalle in diesem Fall Schwefelsäure während des Waschens abgegeben haben.

Die Bestimmung des Ammoniaks geschah nach dem in einer früheren Abhandlung ¹⁾ beschriebenen Verfahren, indem die Methode angewandt und das Ammoniak nach Neßler bestimmt wurde. Es fand sich in 100 ccm Lösung mit aufgeschlämmten Niederschläge 0,15 mg Ammoniakstickstoff, und da die gegenwärtige Menge Kochsalzlösung 0,02 mg Ammoniakstickstoff entsprach, so wurde demgemäß 0,13 mg Ammoniakstickstoff für 60 Milligramm-Äquivalente oder ca. 0,0022 mg pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff gefunden. Wovon diese kleine Menge Ammoniak kommt, das wissen wir nicht, wir sind aber nicht geneigt zu meinen, daß wir es mit Ammoniak zu tun haben, welches mit dem Eieralbumin auskrystallisiert und an dasselbe so fest gebunden ist, daß es nicht einmal durch Waschen mit der sauren Natriumchloridlösung möglich gewesen ist, dasselbe zu beseitigen. Eher würden wir annehmen, daß bei der Koagulation des Eieralbumins während der Analyse eine Ammoniakbildung stattfindet. Wir haben diese Frage in einer früheren Abhandlung ²⁾ gestreift und werden später darauf zurückkommen; hier mögen wir nur als einen Fingerzeig in dieselbe Richtung anführen, daß wir in allen unseren derartigen Versuchen solche kleinen Ammoniakmengen, von derselben Größenordnung wie oben, gefunden haben, unangesehen der Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher das auszuwaschende Eieralbumin auskrystallisiert war. So fanden wir:

Im Versuch Nr. 7, wo das Eieralbumin bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $16,6 \cdot 10^{-6}$ auskrystallisiert war, nach Auswaschen, Lösen und Koagulieren wie oben 0,0027 mg Ammoniakstickstoff pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff, während wir

im Versuch Nr. 9, wo das Eieralbumin bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $8,1 \cdot 10^{-6}$ auskrystallisiert war, in derselben Weise 0,0024 mg Ammoniakstickstoff pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff fanden.

Schließlich möchten wir anführen, daß wir im Versuch Nr. 9 einen Teil des ausgewaschenen Niederschlags in einer anderen Weise behandelten, indem das Eieralbumin nicht durch Lösen mit nachfolgender Erhitzung, sondern dagegen durch Behandlung mit einer reichlichen Menge starkem Alkohol denaturiert wurde. Nach Stehenlassen bis zum nächsten

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 64 (1918).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 70 und 71 (1918).

Tag wurde filtriert, und das denaturierte Eieralbumin mit Wasser gewaschen. Aus dem erhaltenen Filtrat und Waschwasser wurde der Alkohol nach Zugabe von ein wenig Salzsäure abdestilliert, und sodann ein Teil des Rückstands für die Schwefelsäureprobe, die negativ ausfiel, und ein anderer Teil für die Ammoniakbestimmung verwendet; letztere gab 0,0018 mg Ammoniakstickstoff pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff.

Diese Versuche sowie eine Reihe ähnliche, deren Einzelheiten es nicht vonnöten ist anzuführen, zeigen, erstens, daß krystallisiertes Eieralbumin nach Auswaschen mit einer nach Hopkins dargestellten Natriumchloridlösung nachweisbare Schwefelsäuremengen nicht enthält, auch dann nicht, wenn es unter solchen Umständen auskrystallisiert ist, daß die Krystalle vor dem Waschen reichliche Schwefelsäuremengen enthalten. Zweitens ersieht man, daß die kleine Ammoniakmenge, welche wir immer bei der Untersuchung des ausgewaschenen krystallisierten Eieralbumins gefunden haben, immer von derselben Größenordnung und zwar gleich ca. 0,002 mg Ammoniakstickstoff pro Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff ist, unangesehen ob das Eieralbumin mit überschüssigem Ammoniak oder ohne einen solchen Überschuß auskrystallisiert ist. Das bei der Analyse gefundene Ammoniak kommt deshalb wahrscheinlich nicht von Ammoniak oder Ammoniumsulfat, welches mit dem Eieralbumin auskrystallisiert und mit demselben fest verbunden gewesen ist, sondern ist wahrscheinlich durch die Denaturierung des Eieralbumins gebildet worden.

Es ist deshalb als bewiesen zu erachten, daß Schwefelsäure oder Ammoniak, welche mit dem Eieralbumin auskrystallisiert sind, mit einer gesättigten Lösung von Natriumchlorid in 1-prozentiger Essigsäure ausgewaschen werden können, und man darf deshalb aus derartigen Auswaschungsversuchen keine Folgerungen darüber ziehen, inwieweit das auskrystallisierte Eieralbumin Ammoniumsulfat enthält oder nicht.

Nachdem wir, wie oben erwähnt, nachgewiesen hatten, daß die Eieralbuminkrystalle durch Waschen nach Hopkins Schwefelsäure oder Ammoniak abgeben können, war die Frage naheliegend, ob auch der Wassergehalt der Krystalle durch

das Waschen geändert wurde oder nicht. Zur Beantwortung dieser Frage haben wir den unten beschriebenen Versuch angestellt.

Eine größere Menge¹⁾ des im Versuch Nr. 7 angewandten Niederschlags, welcher bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $16,6 \cdot 10^{-6}$ auskrystallisiert und sodann nach Hopkins ausgewaschen war, wurde nach dem Auswaschen mit 700 ccm der essigsauren, gesättigten Natriumchloridlösung, welche mit 2 Gramm-Äquivalenten Ammoniumnitrat (160 g) per Liter²⁾ versetzt war, verrührt. Nach zweitägigem Stehenlassen unter wiederholtem Umschütteln in einem geschlossenen Kolben wurde filtriert, und der Ammoniak- und Proteinstickstoff in abgewogenen Proben vom Filtrat und vom Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge ganz in derselben Weise, wie es früher (siehe S. 218) eingehend beschrieben worden ist, bestimmt. (Versuch I.)

Gleichzeitig damit und in ganz analoger Weise wurde Versuch II ausgeführt, bei welchem eine entsprechende Menge des im Versuch Nr. 7 angewandten, ausgewaschenen Niederschlags mit 700 ccm von Hopkins' Waschflüssigkeit verrührt wurde, nachdem letztere erst mit 4 Gramm-Äquivalenten (320 g) Ammoniumnitrat per Liter versetzt worden war.

Die Analysenresultate der beiden Versuche sind in der Tabelle 38 zusammengestellt.

Tabelle 38 zeigt, daß r , was den ausgewaschenen Niederschlag betrifft, nur 6,9 ist, während diese Größe bei nicht ausgewaschenem krystallisiertem Eieralbumin den Wert 7,86 besitzt (siehe S. 223). Als nun r denjenigen Faktor bedeutet, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffs multipliziert werden muß, um das Gewicht des Eihydrats zu geben, so

¹⁾ Die später ausgeführten Analysen zeigten, daß sie ca. 2 g Proteinstickstoff enthielt.

²⁾ Auch ein sehr reichlicher Zusatz von Ammoniumnitrat zu Hopkins' Waschflüssigkeit gibt zu keinerlei Salzausscheidung Anlaß, und die Eieralbuminkrystalle sind, wie die späteren Analysen zeigen, in die Waschflüssigkeit, auch nach dem Zusatz des Ammoniumnitrats, praktisch gesprochen unlöslich.

Tabelle 38.

Ver- suchs- nummer	100 g Filtrat enthielten		100 g Niederschlag mit anhaltender Mutterlauge enthielten			$r = \frac{100 (a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f}$	Mittel von r
	Ammo- niak-N in g (a _f)	Protein-N in g (p _f)	Marke der Probe	Ammo- niak-N in g (a _b)	Protein-N in g (p _b)		
I	1,7471	0,0004	I	1,4831	2,1941	6,88 ₀	} 6,89 ₀
			II	1,4797	2,2060	6,93 ₀	
			III	1,4840	2,1926	6,86 ₀	
II	3,2846	0,0001	I	2,7985	2,1432	6,90 ₀	} 6,90 ₁
			II	2,7913	2,1771	6,89 ₀	
			III	2,7910	2,1789	6,89 ₇	

zeigt der gefundene, niedrige Wert von r, daß der Niederschlag nach dem Waschen weniger Wasser als vor demselben enthält. Es ist demnach auch in dieser Beziehung eine Änderung in der Zusammensetzung des Niederschlags während des Waschens eingetreten, es ist aber aus dem beschriebenen Versuch nicht zu ersehen, ob es der Niederschlag als ein ganzer ist, welcher einen Teil seines Wassers während des Waschens abgegeben hat, oder ob es nur ein Teil des Niederschlags ist, welcher seinen ganzen oder den größten Teil seines Wassergehalts abgegeben hat, während der übrige Teil unverändert geblieben ist. Wir sind vielmehr geneigt, letzterer Auffassung beizupflichten, indem der Niederschlag nach dem Auswaschen nicht in Wasser klar löslich ist, sondern einen Teil des Eialbumins in denaturierter, unlöslicher Form hinterläßt, und nach einigen orientierenden Versuchen, welche in einem anderen Zusammenhang Erwähnung finden, ist das Denaturieren des Eialbumins von einem Verlust an Hydratwasser begleitet.

Auch Hopkins hat die Bildung von denaturiertem Eialbumin bei der Lösung der ausgewaschenen Krystalle in Wasser wahrgenommen, er betont aber ausdrücklich,¹⁾ daß die Krystalle nach dem Waschen vollständig löslich gewesen sind, und daß der unlösliche Bodensatz erst nach und nach entsteht. Dieser letztere Teil von Hopkins' Angabe steht

¹⁾ l. c. S. 320.

mit unseren Beobachtungen in vollem Einklang, auch wir haben gefunden, daß die Menge des Unlöslichen sich durch Stehenlassen bedeutend vergrößert,¹⁾ wir haben aber niemals einen ausgewaschenen Niederschlag, welcher nach dem Waschen eine vollständig klare wässerige Lösung gab, unter den Händen gehabt. Wir neigen deshalb zu der Meinung, daß die Denaturierung zum Teil während des Waschens eingetreten ist, während das Ausflocken des denaturierten Albumins nach dem Lösungsprozeß erst allmählich vor sich geht, weil die Wasserstoffionenkonzentration der gebildeten Lösung viel größer ist als diejenige, welche dem optimalen Ausflockungspunkt des denaturierten Eieralbumins entspricht. Daß diese große Wasserstoffionenkonzentration zugleich eine fortgesetzte Denaturierung fördert, das haben wir durch andere Versuche, welche in einer folgenden Abhandlung beschrieben werden, dargetan.²⁾

Wenn wir auch durchaus bestrebt gewesen sind, das von Hopkins angegebene Auswaschverfahren zu befolgen, so ist es natürlich möglich, daß Abweichungen zwischen seinem Verfahren und dem unsrigen auf einzelnen Punkten vorkommen können; auch mag es sein, daß Serumalbumin, welches Hopkins, insofern es aus seinen Mitteilungen zu ersehen ist, zu einigen seiner Versuche benutzt hat, sich anders verhält als das Eieralbumin. Wir haben jedenfalls, wie es aus dem vorhergehenden erhellt, gefunden, daß die Zusammensetzung der Krystalle während des Waschens verändert wird, und wie man es an Figur 18 und 19 sieht, welche einige von Herrn Dr. Ö. Winge gemachte Mikrophotographien von Krystallen vor (a) und nach (b) dem Waschen darstellen, ist auch nicht das Aussehen der Krystalle vom Waschen unangegriffen geblieben. Mit bloßen Augen ist aber diese Änderung nicht sichtbar, und wir können Hopkins' Aussage ganz bestätigen, wenn er sagt:

¹⁾ In einer solchen Mischung von Lösung und Niederschlag, welche während einer Woche gestanden hatte, fanden wir somit bei einer quantitativen Bestimmung der Menge sowohl des denaturierten als auch des nicht denaturierten Eieralbumins, daß nicht weniger als 48% der ganzen Menge Proteinstickstoff in der Form denaturierten Eieralbumins vorlag.

²⁾ Vgl. auch Harriette Chick und C. J. Martin, *Journal of Physiology*, Bd. 40, S. 404 (1910), Bd. 43, S. 1 (1911).

(l. c. p. 320) „the fine silky lustre of the crystalline precipitate which is seen when it is suspended in the medium and stirred, is still observable when the last trace of sulphate has been washed away“.

Wir meinen dann aus den im vorhergehenden beschriebenen Versuchen nur die schon oben (S. 247) genannte Folgerung ziehen zu dürfen, daß es nicht möglich ist, durch Auswaschungsversuche nach dem Hopkins'schen Verfahren zu entscheiden, ob das krystallisierte Eieralbumin Ammoniumsulfat als integrierenden Bestandteil enthält oder nicht.

Nach den oben erwähnten, gewissermaßen negativen Versuchsergebnissen ergibt sich die Frage, ob es nicht auf anderem Wege möglich sein sollte, über das besprochene Verhältnis Klarheit zu erlangen. Wir gestehen sofort, daß es uns nicht gelungen ist, einen entscheidenden Beweis in der einen oder der anderen Richtung zu erbringen, es will uns aber doch scheinen, daß das Resultat einiger Untersuchungen anderer Art, welches wir hier mit wenigen Worten erwähnen werden, am leichtesten verständlich wird, wenn man annimmt, daß der auskrystallisierte Niederschlag Schwefelsäure enthält.

Als einen Fingerzeig in diese Richtung können wir anführen, daß es nicht möglich gewesen ist, das Eieralbumin mittels anderer Stoffe als Sulfate zum Krystallisieren zu bringen.¹⁾ Hopkins schreibt,²⁾ daß er viel Zeit einen solchen Stoff zu finden vergeudet hat, daß es ihm aber nicht gelungen ist, und ohne Zweifel haben viele andere Forscher dasselbe versucht. Auch wir haben eine Reihe Versuche mit vielen verschiedenen Salzen gemacht, aber nur bei der Anwendung von Sulfaten haben wir das Eieralbumin in krystallinischer Form bekommen, und immer mit denselben unter dem Mikroskop leicht kennbaren Aussehen. Gleichwie E. G. Willcock³⁾ haben auch wir das Magnesiumsulfat beim Krystallisieren des Eieralbumins

¹⁾ Zusatz während der Korrektur: Siehe die Nachschrift S. 216.

²⁾ l. c. S. 319.

³⁾ Journal of Physiologie, Bd. 37, S. 32 (1908).

brauchbar gefunden. Dagegen ist die Löslichkeit des Kaliumsulfats in Wasser so gering, daß selbst eine gesättigte Kaliumsulfatlösung bedeutende Mengen Eieralbumin zu lösen vermag, und betreffs des Natriumsulfats gilt dasselbe, wenn auch in weit kleinerem Maßstab. Benutzt man indessen eine gesättigte Lösung dieser beiden Sulfate, so gelingt die Krystallisation des Eieralbuminsulfats ebenso leicht, wie bei der Anwendung von Ammoniumsulfatlösungen. Wir haben deshalb auch ammoniumsulfatfreie Eieralbuminlösungen durch wiederholtes Krystallisieren und Waschen der Krystalle mit einer gesättigten Kalium-Natriumsulfatlösung erhalten können. Bei einem solchen Versuch, wo sechs mal mittels Ammoniumsulfats umkrystallisiertes Eieralbumin als Ausgangsmaterial diente, und während dessen die vorwärtsschreitende Reinigung durch Analysen von Filtraten, Waschflüssigkeiten und „Rückständen“¹⁾ verfolgt wurde, fanden wir, daß 92% der gesamten Menge Ammoniumsulfat durch das erste Krystallisieren und Waschen mittels der Kalium-Natriumsulfatlösung beseitigt wurden, bei der zweiten Krystallisation mit nachfolgendem Waschen wurden weiter 6,6% weggeschaffen, und der Rest blieb in der Mutterlauge von der dritten Krystallisation. Der Niederschlag wurde noch dreimal umkrystallisiert und zwar konnte man in der Mutterlauge von diesen Krystallisationen Ammoniak nachweisen, die Menge war aber nicht einmal $\frac{1}{20000}$ der ursprünglich gegenwärtigen.

Wir können noch hinzufügen, daß wir bei der Analyse des sechsmal mittels Kalium-Natriumsulfats umkrystallisierten Eieralbumins eine Ammoniakmenge fanden, welche 0,0019 mg Ammoniakstickstoff auf dem Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff entsprach. Es ist schon oben erwähnt (s. S. 246), daß wir geneigt sind zu meinen, daß diese kleine Ammoniakmenge durch die Koagulation des Eieralbumins während der Analyse gebildet worden ist.

Aus diesem Versuch ersieht man, daß das Eieralbumin sich ebenso leicht von Ammoniumsulfat als von Aschenbestandteilen reinigen läßt,²⁾ wie es in einer früheren Abhandlung besprochen ist, und es handelt sich demzufolge hier gewiß nur

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 20 (1918).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 19 (1918).

um einen Ersatz einer Salzlösung durch eine andere. Die gebildeten Krystalle haben indessen in beiden Fällen ganz dasselbe Aussehen sowohl makroskopisch als auch unter dem Mikroskop, und es ist deshalb höchst wahrscheinlich, daß sie in derselben oder doch in analoger Weise zusammengesetzt sind. Wir haben keine Bestimmung des Faktors, r , (s. S. 223) für die solchermaßen gewonnenen Krystalle ausgeführt; da es uns aber nicht möglich gewesen ist, diese Krystalle ohne Anwendung von Sulfaten darzustellen, so will es uns wahrscheinlich scheinen anzunehmen, daß die Krystalle nicht aus reinem, wasserhaltigem Eieralbumin bestehen, sondern auch noch die Sulfatgruppe SO_4 enthalten.

Diese Annahme wird durch einige Untersuchungen gestützt, deren Einzelheiten erst in der folgenden Abhandlung erwähnt werden, deren Resultate aber hier kurz zu erwähnen sind, insofern als sie für die Beantwortung der hier behandelten Frage von Belang sind.

Unter den Faktoren, welche den Zustand des Gleichgewichts zwischen dem auskrystallisierten Niederschlag und der umgebenden Mutterlauge bestimmen, ist die Wasserstoffionenkonzentration — wie es schon in einer früheren Abhandlung¹⁾ erwähnt ist — von wesentlicher Bedeutung. Wenn es beim Auskrystallisieren des Eieralbumins sich um die Krystallisation des Ampholyten selbst, des Eihydrats, ohne überschüssige Schwefelsäure oder überschüssiges Ammoniak handelte, dann müßte man, wie es besonders von Michaelis²⁾ hervorgehoben worden ist, erwarten, daß das Krystallisationsoptimum bei einer dem isoelektrischen Punkte des Albumins entsprechenden Wasserstoffionenkonzentration zu finden war. Es zeigte sich aber, daß dies nicht der Fall ist, indem der isoelektrische Punkt des Eieralbumins bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $15,7 \cdot 10^{-6}$, dem $p_H = 4,80$ entsprechend, liegt, während das Optimum der Krystallisation laut Untersuchungen, die in

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 25 u. f. (1918).

²⁾ Bioch. Zeitschr., Bd. 30, S. 143 (1910) und Bd. 47, S. 250 (1912).
— L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration S. 44 (1914).

der folgenden Abhandlung erwähnt werden, bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $26-27 \cdot 10^{-6}$, dem $p_H = 4,58$ liegt. Bei dieser Wasserstoffionenkonzentration auskrystallisiert enthält indessen das Eieralbumin greifbare Mengen überschüssiger Schwefelsäure, welche, wie Figur 17 (s. S. 238) zeigt, etwa 8 ccm $n/1000$ -Schwefelsäure auf ein Milligramm-Äquivalent Proteinstickstoff, somit 1 Äquivalent Schwefelsäure auf 125 Äquivalente Proteinstickstoff, betragen. Es kann deshalb kaum in Zweifel gestellt werden, daß es in diesem Fall, wo die Krystallisationsbedingungen am günstigsten sind, ein Eieralbuminsulfat auskrystallisiert, und es ist dann höchst wahrscheinlich, daß der auskrystallisierte Niederschlag immer schwefelsäurehaltig ist. Dieses steht in keiner Weise im Gegensatz zu dem, was wir in einem früheren Abschnitt über den Gehalt der Krystalle an Überschuß von Schwefelsäure oder Ammoniak gefunden haben, und welches wir in Figur 17 (s. S. 238) graphisch wiedergegeben haben.

Betrachtet man nämlich den Schwefelsäuregehalt des beim Krystallisationsoptimum ($26-27 \cdot 10^{-6}$) auskrystallisierten Niederschlags als den normalen, so zeigt Figur 17, daß Niederschläge, welche bei Wasserstoffionenkonzentrationen größer als die optimalen auskrystallisiert sind, etwas Schwefelsäure, während bei schwächeren Wasserstoffionenkonzentrationen auskrystallisierte Niederschläge ein wenig Ammoniak mitgerissen haben. Weiter werden die in der folgenden Abhandlung erwähnten Untersuchungen zeigen, daß diese Änderung der Zusammensetzung der Krystallmasse von einer Änderung der Löslichkeit begleitet ist, indem die beim Krystallisieren unter sonst identischen Bedingungen in der Lösung bleibende Menge Eihydrat mit der Entfernung von der optimalen Wasserstoffionenkonzentration stark ansteigt, gleichgültig in welcher Richtung diese Entfernung stattfindet. Das Verhältnis ist also ein ganz ähnliches wie z. B. bei der Fällung einer Aluminiumsulfatlösung mittels einer Natriumhydroxydlösung. Das wesentliche Produkt dieser Fällung ist Aluminiumhydroxyd, die Vollständigkeit der Fällung und die Zusammensetzung des Niederschlags sind aber vom Mengenverhältnis der reagierenden Stoffe im

höchsten Grad abhängig. Wird ein Unterschub von Natriumhydroxyd zugegeben, so ist die Fällung unvollständig und der Niederschlag enthält Schwefelsäure, während Überschub von Natriumhydroxyd bewirken wird, daß ein Teil des Niederschlags als Natriumaluminat gelöst und der ungelöste Rest alkalihaltig wird.

Die oben erwähnten Verhältnisse machen es nach unserem Dafürhalten sehr wahrscheinlich, daß der auskrystallisierte Niederschlag ein Sulfat ist, welches bei der Krystallisation eine von der Wasserstoffionenkonzentration abhängige Menge Schwefelsäure oder Ammoniak mitgerissen hat, welche Menge sich mittels Figur 17 mit großer Annäherung schätzen läßt. Dagegen erhält man aus diesen Untersuchungen keinerlei Auskünfte darüber, wie weit die Krystalle außerdem auch noch Ammoniumsulfat enthalten oder nicht. P. Pfeiffer und seine Mitarbeiter¹⁾ haben in einer Reihe interessanter Arbeiten das Verhalten einiger der gewöhnlichen Aminosäuren und Polypeptide Salzen gegenüber untersucht und haben die Existenz einer Reihe wohldefinierter Verbindungen dieser Ampholyten mit den angewandten Salzen nachgewiesen. Es ist naheliegend, von diesem Befund ausgehend, Analogiefolgerungen über die Zusammensetzung derjenigen Produkte zu ziehen, welche bei der Ausfällung der Proteinstoffe oder der Auskrystallisation derselben durch Salzzusatz erhalten werden. Ein direkter Beweis läßt sich natürlich auf diesem Weg nicht erbringen, und wir haben weder in den Arbeiten Pfeiffers noch in der sonstigen vorliegenden Literatur und auch nicht in den Resultaten unserer eigenen Versuche einen entscheidenden Beweis dafür finden können, daß die Eieralbuminkrystalle Ammoniumsulfat als integrierenden Bestandteil enthalten. Wir müssen, wie es schon im Abschnitt A (s. S. 226) erwähnt ist, es für wahrscheinlich halten, daß die Eieralbuminkrystalle entweder ammoniumsulfatfrei sind, oder nur ganz kleine Mengen Ammoniumsulfat enthalten.

¹⁾ P. Pfeiffer und J. v. Modelski, Diese Zeitschr., Bd. 81, S. 329 (1911), Bd. 85, S. 1 (1913); P. Pfeiffer und Fr. Wittka, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 48, S. 1041, 1289 und 1938 (1915); P. Pfeiffer und J. Würzler, Diese Zeitschr., Bd. 97, S. 128 (1916).

Fußend auf den in dieser Abhandlung mitgeteilten Untersuchungen meinen wir dann die Frage nach der Zusammensetzung der Eieralbuminkrystalle folgenderweise beantworten zu können:

Die Eieralbuminkrystalle bestehen in der Hauptsache aus Eieralbumin und Wasser, und der Wassergehalt der Krystalle ist in weiter Ausdehnung von den Krystallisationsbedingungen unabhängig, auf 1 g Eieralbumin findet man etwa 0,22 g Wasser.

Neben Eieralbumin und Wasser enthalten die Krystalle wahrscheinlich immer ein wenig Schwefelsäure und müssen deshalb als aus einem wasserhaltigen Eieralbuminsulfat bestehend betrachtet werden. Der normale Schwefelsäuregehalt der Krystalle kann nicht genau angegeben werden, beträgt aber wahrscheinlich auf ca. 125 Äquivalente Proteinstickstoff 1 Äquivalent Schwefelsäure.

Ein wasserhaltiges Eieralbuminsulfat von dieser Zusammensetzung scheidet sich wahrscheinlich nur bei der für die Krystallisation optimalen Wasserstoffionenkonzentration ($h = 26 - 27 \cdot 10^{-6}$, $p_{H} = 4,58$) aus. Bei größeren Wasserstoffionenkonzentrationen enthalten die Krystalle mehr Schwefelsäure; möglicherweise bildet sich hier ein anderes, schwefelsäurereicheres Salz, indem die Krystalle eine zugespitzte Form (s. S. 263) bekommen, und die Auskrystallisation weniger vollständig, die Löslichkeit der Krystalle somit größer, als bei dem Krystallisationsoptimum ist. Bei Wasserstoffionenkonzentrationen, die kleiner sind als diejenige, welche dem Krystallisationsoptimum entspricht, ist der Gehalt der Krystalle an überschüssiger Schwefelsäure kleiner als der oben angegebene (1 Äquivalent Schwefelsäure auf etwa 125 Äquivalente Proteinstickstoff). Die wahrscheinlichste Erklärung hiervon scheint es uns zu sein, daß bei der Krystallisation unter diesen Bedingungen Ammoniak mit niedergedrungen ist; die Form der Krystalle ist die normale (s. S. 263), die Löslichkeit ist aber größer als bei dem Krystallisationsoptimum.

Die Eieralbuminkrystalle enthalten wahrscheinlich kein Ammoniumsulfat als integrierenden Bestandteil, natürlich kann aber das vom Albuminsulfat mitgerissene Ammoniak innerhalb gewisser Grenzen als in der Form von Ammoniumsulfat gegenwärtig zu sein aufgefaßt werden.

In diesem Fall berechnet man leicht die Größe y , welche ja denjenigen Faktor bezeichnet, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffs multipliziert werden muß, um das Gewicht des in die Krystalle eingetretenen Ammoniumsulfats zu geben. Geht die Krystallisation z. B. bei einer Wasserstoffionenkonzentration gleich $13 \cdot 10^{-6}$ vor sich, dann enthalten die Krystalle weder Schwefelsäure noch Ammoniak in Überschuß, und das heißt — laut dem oben Angeführten —, daß eine mit dem normalen Schwefelsäuregehalt der Krystalle äquivalente Menge Ammoniak, somit 1 Äquivalent Ammoniakstickstoff auf etwa 125 Äquivalente Proteinstickstoff mitgerissen ist. Da man nun das Gewicht des Ammoniakstickstoffs mit 4,7163 multiplizieren muß, um die entsprechende Menge Ammoniumsulfat zu erhalten, so hat man

$$125 y = 4,7163$$

$$\text{also } y = \text{etwa } 0,04.$$

Man sieht demnach, daß y — falls unsere Voraussetzungen stichhaltig sind — eine ganz kleine Größe wird, und etwas Ähnliches gilt das Produkt $s \cdot y$ (s. S. 218). Der Fehler, welchen man durch Vernachlässigung dieser Größen begeht, ist deshalb nicht von wesentlicher Bedeutung, es muß aber — wie schon hervorgehoben — nicht vergessen werden, daß es uns, was diesen Punkt betrifft, nicht möglich gewesen ist, unzweideutige und entscheidende Resultate zu erhalten.

D. Bemerkungen über den Charakter des Krystallisationsprozesses und über die Form der Krystalle.

Ogleich das Fällen der Proteinstoffe durch Zusatz von Salz der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen ist, so ist man bis jetzt weit davon entfernt, über den Charakter des Fällungsprozesses im Klaren zu sein. Die gewöhnlichste Auffassung dieses Prozesses ist wohl diejenige, für welche besonders K. Spiro¹⁾ eingetreten ist, und laut welcher es bei der Salzfällung der Proteinstoffe sich um einen Prozeß der Verteilung zwischen zwei Phasen, einer wässerigen, salz-

¹⁾ Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie, Bd. 4, S. 300 (1904).

reichen, aber proteinarmen, und einer wasser- und salzarmen, aber proteinreichen Phase handelt. Diese letztere, welche den Niederschlag repräsentiert, besteht oft aus feinen Tropfen, welche unter Bildung globulitähnlicher Massen je nach den obwaltenden Umständen mehr oder weniger schnell erstarren. Da nun der Krystallisationsprozeß des Eieralbumins mittels Ammoniumsulfats gewiß dem Wesen nach nicht von der bei etwas stärkerer Ammoniumsulfatkonzentration stattfindenden Fällung des Albumins als amorpher Niederschlag verschieden ist, so ist es naheliegend, den Krystallisationsprozeß auch als eine Phasenteilung aufzufassen. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, daß aus unreinen Lösungen das Eieralbumin oft in der Form kleiner zu Globuliten vereinigten Nadeln auskrystallisiert; ein Beweis liegt ja aber nicht darin. Auch könnte man eine Stütze dieser Auffassung in dem Umstand sehen, daß das Eieralbumin auch selbst nach Reinigung durch wiederholte Umkrystallisationen öllartig ausgeschieden werden kann, wenn die Wasserstoffionenkonzentration höher als die der Krystallisation optimale ist, und daß diese öllartige Masse dann allmählich krystallinisch erstarren kann. Hierzu ist indessen zu bemerken, daß es sich in diesem Fall wahrscheinlich, wie schon oben (S. 256) erwähnt, um die Auskrystallisation einer Mischung des gewöhnlichen Albuminsulfats und einer schwefelsäurereicheren Verbindung handelt.

Unseren Erfahrungen gemäß findet aber bei einer normal verlaufenden Krystallisation des Eieralbumins keine Phasenteilung der obigen Art statt, und wir haben vor der Krystallisation Tropfenbildung weder makroskopisch noch mikroskopisch konstatieren können. Versetzt man eine Eieralbuminlösung mit so viel einer starken Ammoniumsulfatlösung, daß ein wenig amorpher Niederschlag nach dem Umrühren bleibt, und filtriert man diesen Niederschlag ab, so bekommt man ein klares Filtrat ganz vom Charakter einer übersättigten Lösung. Geimpft und gerührt krystallisiert es schnell, ohne Impfung aber kann es stundenlang klar bleiben, um sodann ohne scheinbaren Anlaß zu krystallisieren anzufangen. Kurz, es scheint kein Grund vorhanden zu sein, die Eieralbumin-

Krystallisation anders als jegliche andere Krystallisation aufzufassen: unserer Meinung nach ist hier nur die Rede von dem Krystallisieren einer übersättigten Lösung eines schwierig und langsam krystallisierenden Stoffes.

F. G. Hopkins¹⁾ ist bei seinen Studien über die Darstellung von reinem Eieralbumin durch Krystallisation mittels Ammoniumsulfats zu einer ganz ähnlichen Auffassung gelangt: «I have frequently observed, in cases in which the process has appeared slower than usual, that slight shaking of the flask has been quickly followed by complete separation. On one occasion a solution of the product at this stage, to which ammonium sulphate had been added in quantity too small to produce any definite precipitate, remained, while undisturbed, practically clear for no less than three weeks. On then shaking the flask a bulky precipitate wholly composed of crystals separated within an hour. The mixture behaved as a supersaturated solution» (l. c. p. 311).

Wir können dann auch nicht Fr. N. Schulz beipflichten, wenn er hervorhebt,²⁾ daß ein Wesensunterschied zwischen der Krystallisation der Eiweißstoffe und anderen Krystallisationen vorhanden ist. Die Beweisführung von Schulz geht am deutlichsten aus seinen eigenen Worten hervor (l. c. S. 40): «Die Veranlassung zur Krystallisation ist in den beschriebenen Fällen die Entziehung der Lösungsbedingungen. Diese Entziehung ist keine allmähliche; es geht der krystallinischen Abscheidung immer eine wesentliche Übersättigung voraus. Die Abscheidung erfolgt ziemlich plötzlich und in viel reichlicheren Mengen, als sie der Entziehung der Lösungsbedingung, die zur Abscheidung geführt hat, entspricht.

Bei der Darstellung des krystallinischen Eieralbumins nach der Ammonsulfatmethode können z. B. wenige Tropfen konzentrierter Ammonsulfatlösung genügen, um die schließliche Ausfällung des krystallisierenden Bestandteils aus mehreren 100 ccm einer Lösung zu bewirken, die ohne Zusatz dieser wenigen

¹⁾ Journal of physiologie Bd. 25, S. 306 (1900).

²⁾ Die Krystallisation von Eiweißstoffen, Jena 1901.

Tropfen dauernd klar geblieben wäre. Durch diese minimale Konzentrationserhöhung werden nicht nur Spuren von Eiweiß zur Krystallisation gebracht, sondern große Mengen. Namentlich beim Umkrystallisieren zeigt es sich, daß durch den geringen Mehrgehalt an Salz der krystallisierende Bestandteil fast quantitativ aus seiner Lösung entfernt wird. Auf diesen Umstand ist es auch zurückzuführen, daß es nicht gelingt, durch allmähliches Erhöhen der Konzentration große Krystalle zu züchten, denn trotz aller Vorsicht erfolgt die Krystallisation plötzlich.

Es besteht hier ein eklatanter Unterschied gegenüber den meisten anderen Krystallisationen, bei denen, falls die Krystallisation einmal begonnen hat, die Krystallabscheidung bis zu einem gewissen Grade proportional der Entziehung der Lösungsbedingungen ist.

Schulz ist also darüber im Klaren, daß ein Stadium der Krystallisation vorausgeht, in welchem die Lösung als eine übersättigte zu erachten ist, übrigens sind aber die von ihm hervorgezogenen Umstände nicht ganz richtig beschrieben, oder jedenfalls ist seine Erklärung derselben nicht ganz zutreffend. Es ist somit ganz richtig, daß einige wenige Tropfen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bewirken können, daß die Krystallisation in mehreren hundert Kubikzentimetern anfängt, wofern die Lösung im voraus reichliches Ammoniumsulfat enthält; eine solche Lösung wird aber nicht, wie Schulz schreibt, ohne diese wenigen Tropfen klar bleiben. Sie wird, wie es in der folgenden Abhandlung des näheren erwähnt wird, nach kürzerer oder längerer Zeit krystallisieren, die Krystallisationsgeschwindigkeit aber ist von dem Grad der Übersättigung abhängig. Es ist deshalb auch nicht zutreffend, wenn Schulz schreibt, daß ein kleiner Zuwachs des Salzgehalts eine beinahe quantitative Ausscheidung des krystallisierenden Stoffes hervorrufen kann. Es hat sich im Gegenteil herausgestellt, daß eine Vergrößerung des Ammoniumsulfatgehalts, innerhalb gar nicht enger Grenzen, eine gleichmäßig ansteigende Krystallausscheidung bewirkt. Um dieses darzutun, ist es indessen notwendig, darauf aufmerksam zu sein,

nicht nur wie viel Albumin die Mutterlauge nach beendeter Krystallisation noch erhält, sondern auch, wann die Krystallisation wirklich zu Ende ist, mit anderen Worten, welche die Krystallisationsgeschwindigkeit ist, und dieselbe wächst schnell mit ansteigender Salzkonzentration. Der von Schulz angeführte Unterschied zwischen der Krystallisation der Proteinstoffe und einer gewöhnlichen Krystallisation existiert deshalb nicht, jedenfalls nicht wenn von Eialbumin die Rede ist. Es ist dann auch — im Gegensatz zu Schulz — sowohl uns als auch anderen Forschern ohne irgend welche Schwierigkeiten durch langsames Krystallisieren ziemlich große Eialbuminkrystalle darzustellen gelungen, indem die Ammoniumsulfatlösung nach und nach im Laufe einiger Tage oder Wochen zugesetzt wurde.

Wir meinen also die Krystallisation des Eialbumins als eine gewöhnliche Krystallisation auffassen zu müssen, und wir möchten in diesem Zusammenhang nur noch ein paar Bemerkungen über den Wassergehalt der Krystalle hinzufügen. Wir haben keine Versuche angestellt, um möglicherweise zu entscheiden, ob das in den Eialbuminkrystallen vorhandene Wasser als Konstitutionswasser, Krystallwasser oder Quellungswasser¹⁾ aufzufassen ist, weil diese Frage für die von uns studierten Verhältnisse belanglos ist. Wir unterlassen jedoch nicht zu bemerken, daß Harriette Chick und C. J. Martin²⁾ gefunden haben, daß mittels reichlichen Ammoniumsulfats gefälltes Eialbumin einen Teil reines Wasser abgeben kann, wenn es einem starken Druck unterworfen wird. Der gefällte Niederschlag wurde zuerst zwischen Filtrierpapier gepreßt und danach zwischen mit Infusorienerde umgebenes Filtrierpapier angebracht, wonächst er einem Druck von 3 Tons auf den Quadratzoll unterworfen wurde. Es zeigte sich dadurch, daß die erhaltene ausgepreßte Flüssigkeit verhältnismäßig mehr

¹⁾ Betreffs des Unterschieds zwischen Krystallwasser und Quellungswasser wird auf eine interessante Abhandlung von J. R. Katz «Untersuchungen über die Bindung des Quellungswassers in quellbaren Krystallen» (diese Zeitschrift Bd. 95, S. 1 (1915) verweisen.

²⁾ Biochemical Journal Bd. 7, S. 391 (1913).

Wasser und weniger Ammoniumsulfat als die Mutterlauge enthielt, und Chick und Martin folgerten hieraus, daß etwas des in dem gefällten Eieralbumin gegenwärtigen Wassers («imbibed water») aus dem Niederschlag gepreßt worden sei.

Wir haben ein paar Versuche mit auskrystallisiertem Eieralbumin auf ganz ähnliche Weise gemacht, haben aber kein Auspressen von Wasser beobachten können. Wir haben sowohl die Mutterlauge als auch den Preßsaft, welchen wir in 9 Fraktionen sammelten, analysiert. Das Verhältnis zwischen Wasser und Ammoniumsulfat war mit großer Annäherung dasselbe in der Mutterlauge und in allen den 9 Fraktionen, und es war keine Andeutung an eine Auspressung des in den Krystallen vorhandenen Wassers zu beobachten.

Zum Schluß werden wir ein paar Versuche, welche wir, um wohlausgebildete Eieralbuminkrystalle unter verschiedenen Krystallisationsbedingungen darzustellen, ausgeführt haben, kurz erwähnen. Die erhaltenen Resultate stimmen in der Hauptsache, nicht aber in allen Einzelheiten mit E. Artinis Angaben in der Abhandlung St. Bondzynski und L. Zoja¹⁾ und mit den späteren Untersuchungen von A. Wichmann.²⁾

Wir haben 4 Hauptversuche dieser Art ausgeführt, welche wir Nr. 1—4 bezeichnen. Herr Professor Dr. O. B. Böggild hat uns das Wohlwollen gezeigt, alle vier Proben einer krystallographischen Untersuchung zu unterziehen, und dem Herrn Dr. Ö. Winge sind wir für einige Mikrophotographien der Krystallproben zum Dank verpflichtet.

Versuch Nr. 1. 350 ccm einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung, aus welcher die Hauptmasse des Albumins schon auskrystallisiert und abfiltriert war, wurde nach und nach im Laufe dreier Wochen mit in allem 5 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter wiederholtem Schütteln versetzt, und sodann weitere neun Wochen der Krystallisation überlassen. Eine Analyse ergab, daß die Lösung auf 100 g Wasser

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 19, S. 5 (1893).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 575 (1899).

1,104 g Eihydrat¹⁾ und
26,620 g Ammoniumsulfat

enthielt.

Es handelt sich also hier um eine Auskrystallisation in einer proteinarmer, aber ammoniumsulfatreichen Lösung.

Versuch Nr. 2. Die Krystallisation ging hier von statten im Laufe von vier Tagen in einer proteinreichen, aber ammoniumsulfatarmer Lösung, indem auf 100 g Wasser

22,879 g Eihydrat und
21,404 g Ammoniumsulfat

gefunden wurden.

Während diese beiden Versuche mit solchen Lösungen ausgeführt wurden, die weder Schwefelsäure noch Ammoniak in Überschuß enthielten (Versuch Nr. 1: $p_H = \text{ca. } 5,00$; Versuch Nr. 2: $p_H = \text{ca. } 4,8$), so enthielt die beim

Versuch Nr. 3 benutzte Lösung ein wenig überschüssiges Ammoniak ($p_H = \text{ca. } 5,3$) und die beim Versuch Nr. 4 benutzte Lösung ein wenig überschüssige Schwefelsäure ($p_H = \text{ca. } 4,4$).

Im Versuche Nr. 3 kamen auf 100 g Wasser

8,594 g Eihydrat und
25,959 g Ammoniumsulfat.

Für Versuch Nr. 4 haben wir keine genaue Analyse, der Eihydratgehalt war aber hier ungefähr 4,3 g auf 100 g Wasser; die Krystallisation dauerte in beiden Fällen ca. 3 Wochen.

An Fig. 20—23, die Mikrophotographien der erhaltenen Krystalle darstellen, sieht man deutlich, daß die bei der größten Wasserstoffionenkonzentration ($p_H = \text{ca. } 4,4$, Versuch Nr. 4) ausgeschiedenen Krystalle eine mehr zugespitzte Form als die übrigen haben.

Die Aussage Professor Böggilds über die krystallographische Untersuchung lautet wie folgt:

«Die Krystalle, welche in allen vier Präparaten gleichartig entwickelt, sind scheinbar rhombisch und haben die Form

¹⁾ Der Faktor r wurde zu 7,86 gerechnet (siehe S. 223).

sehr regelmäßiger Linealen; die größeren Krystalle haben die Dimensionen ca. $0,2 \times 0,015 \times 0,001$ mm. Die Enden werden von einem Doma begrenzt, dessen Flächen einen Winkel von etwa 40° miteinander bilden (mit der Längenrichtung etwa 70°). Die Krystalle sind farblos; die Lichtbrechung ist bedeutend größer als die der umgebenden Flüssigkeit; es ist von Doppelbrechung nicht die Spur sichtbar.»

Es kann nach dem oben Vorgebrachten wohl kaum Zweifel darüber sein, daß es sich bei der Krystallisation des Eieralbumins um die Ausscheidung wohl entwickelter, meßbarer, für den betreffenden Stoff charakteristischer Krystalle handelt, was wieder für unsere Auffassung der Eieralbuminkrystallisation als einen Prozeß von ganz derselben Art wie einer gewöhnlichen Krystallisation eine Stütze ist.

Übersicht.

Abschnitt A.

1. Mittels eines auf dem Prinzip der Proportionalitätsmethode gegründeten Verfahrens wird es nachgewiesen, daß die Eieralbuminkrystalle bedeutende Mengen Wasser enthalten, und zwar ca. 0,22 g Wasser auf jedes Gramm Eieralbumin, indem der Faktor, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffs multipliziert werden muß, um das Gewicht der Krystalle zu geben, ca. 7,86 ist, während derjenige Faktor, womit das Gewicht des Proteinstickstoffs multipliziert werden muß, um das Gewicht des wasserfreien Eieralbumins zu geben, nur ca. 6,4 beträgt.

2. Der Wassergehalt der Eieralbuminkrystalle ist — innerhalb ziemlich weiter Grenzen — von den Krystallisationsbedingungen (Krystallisationszeit und Temperatur, Ammoniumsulfat-, Protein- und Wasserstoffionenkonzentration) unabhängig.

Abschnitt B.

1. Es wird auseinandergesetzt, wie man mittels der in der vorangehenden Abhandlung gefundenen Resultate des Säure- und Basebindungsvermögens des Eieralbumins betrefFs und

unter Anwendung des Prinzips der Proportionalitätsmethode den eventuellen Gehalt der Eieralbuminkrystalle an Überschuß von Schwefelsäure oder Ammoniak bestimmen kann.

2. Wenn die Krystallisation des Eieralbumins bei einer Wasserstoffionenkonzentration von ca. $13 \cdot 10^{-6}$ vor sich geht, dann enthalten die ausgeschiedenen Krystalle keinen Überschuß weder von Schwefelsäure noch von Ammoniak; bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen als ca. $13 \cdot 10^{-6}$ werden die Krystalle mit überschüssiger Schwefelsäure, bei niedriger Wasserstoffionenkonzentration mit überschüssigem Ammoniak ausgeschieden, und der Gehalt dieser Stoffe ist um so größer, je weiter die Wasserstoffionenkonzentration von $13 \cdot 10^{-6}$ entfernt ist.

3. Bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $13 \cdot 10^{-6}$ enthält das Einhydrat vor der Krystallisation weder überschüssige Schwefelsäure noch überschüssiges Ammoniak, und es krystallisiert — wie unter 2. gesagt — ebenfalls ohne Überschuß dieser Stoffe aus. Bei höherer Wasserstoffionenkonzentration als ca. $13 \cdot 10^{-6}$ krystallisiert das Eieralbumin mit ein bißchen weniger überschüssiger Schwefelsäure und bei niedrigerer Wasserstoffionenkonzentration mit ein bißchen weniger überschüssigem Ammoniak aus, als es vor der Krystallisation enthielt.

Abschnitt C.

1. Es wird durch eine Reihe Versuche dargetan, daß Schwefelsäure oder Ammoniak, welches mit dem Eieralbumin auskrystallisiert ist, durch wiederholtes sorgfältiges Waschen der Krystalle mit Hopkins' Flüssigkeit, eine gesättigte Lösung von Natriumchlorid in 1-prozentiger Essigsäure, weggeschaffen werden kann.

2. Auf der Grundlage der unter 1. genannten Versuchsergebnisse, verglichen mit anderen während des Waschens beobachteten Ereignissen, meinen wir aussprechen zu dürfen, daß es nicht möglich ist, durch das von Hopkins angegebene Verfahren zu entscheiden, ob das krystallisierte Eieralbumin Ammoniumsulfat als integrierenden Bestandteil enthält oder nicht.

3. Da es uns ohne Anwendung von Sulfaten nicht möglich gewesen ist, die Eieralbuminkrystalle darzustellen, so wird die Annahme uns wahrscheinlich vorkommen, daß die Krystalle nicht lediglich aus reinem wasserhaltigen Eieralbumin bestehen, sondern daß sie zugleich die Sulfatgruppe SO_4 in kleiner Menge enthalten. Diese Auffassung wird durch Untersuchungen anderer Art, welche ausführlich beschrieben werden, gestützt.

4. Der Schluß des Abschnitts enthält eine Übersicht darüber, wieweit und wie es auf der Grundlage der in dieser Abhandlung mitgeteilten Untersuchungen möglich ist, die Frage nach der Zusammensetzung der Eieralbuminkrystalle zu beantworten.

Abschnitt D.

1. Es wird eine Reihe Betrachtungen über den Charakter des Auskrystallisierungsprozesses und über die Form und übrigen Eigenschaften der ausgeschiedenen Krystalle vorgeführt, und wir ziehen aus diesen Erwägungen den Schluß, daß kein Grund vorliegt, die Krystallisation des Eieralbumins anders als irgendwelcher anderen Krystallisation aufzufassen, es ist nach unserem Dafürhalten nur die Rede von der Krystallisation einer übersättigten Lösung eines schwierig und langsam krystallisierenden Stoffes.

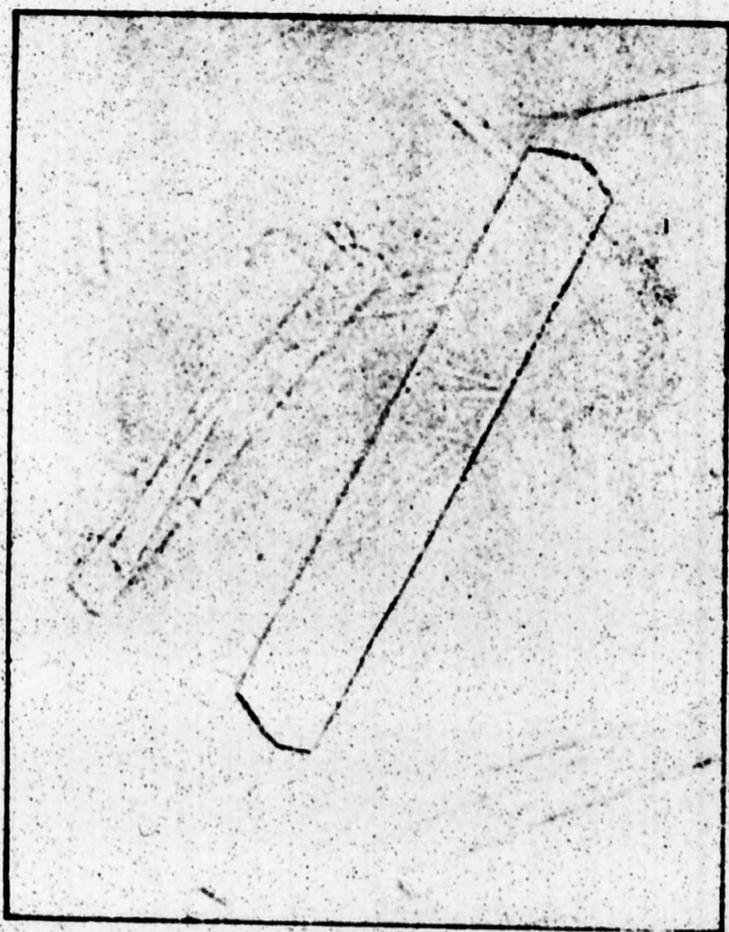
März 1917.

Nachschrift.

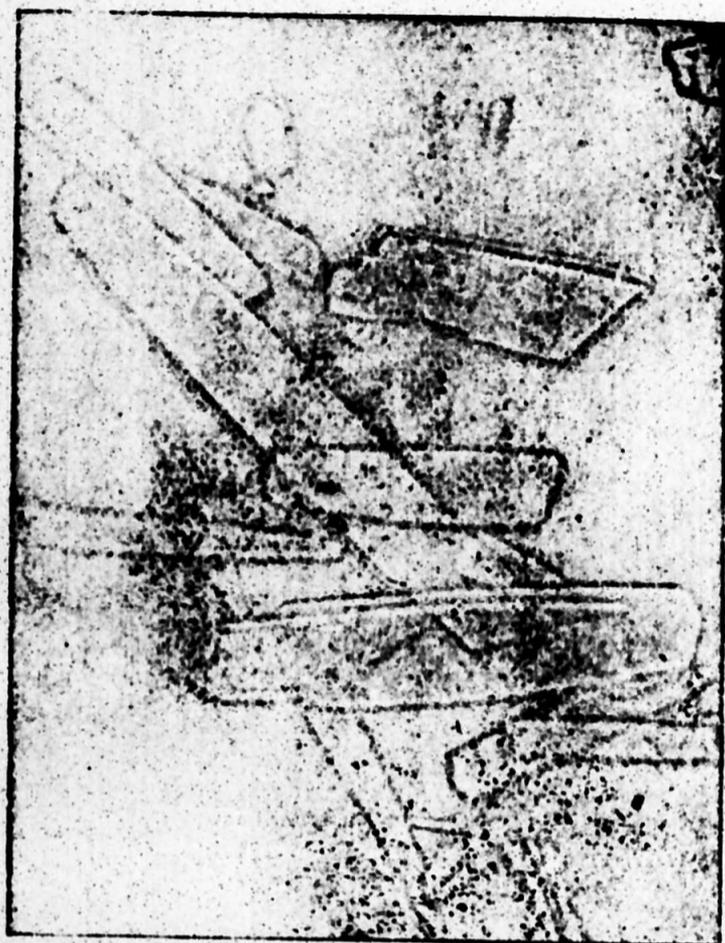
(Zusatz während der Korrektur.)

Nachdem das Manuskript obiger Abhandlung schon druckfertig war, ist es uns gelungen, auch durch Anwendung einer angemessenen Mischung von primären und sekundären Phosphaten das Eieralbumin in krystallinischem Zustand, wahrscheinlich in der Form eines Phosphats abzuscheiden. Die genauere Untersuchung dieses krystallinischen Niederschlags, der unter dem Mikroskop ein ähnliches Aussehen wie der oben beschriebene zeigt, ist noch weit davon entfernt, zu Ende gebracht zu sein.

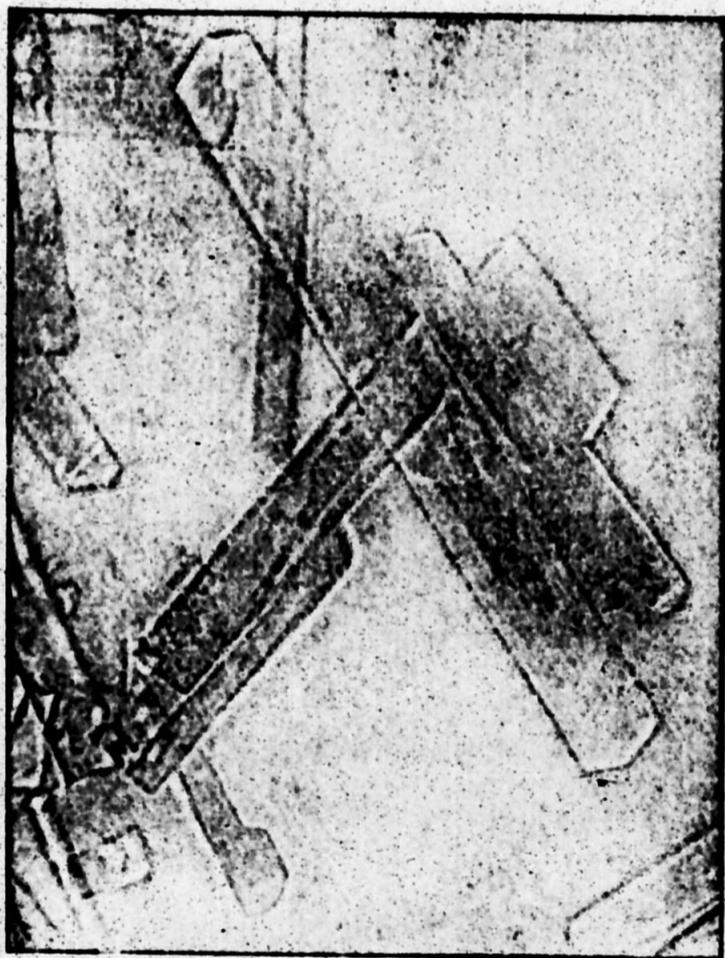
September 1917.



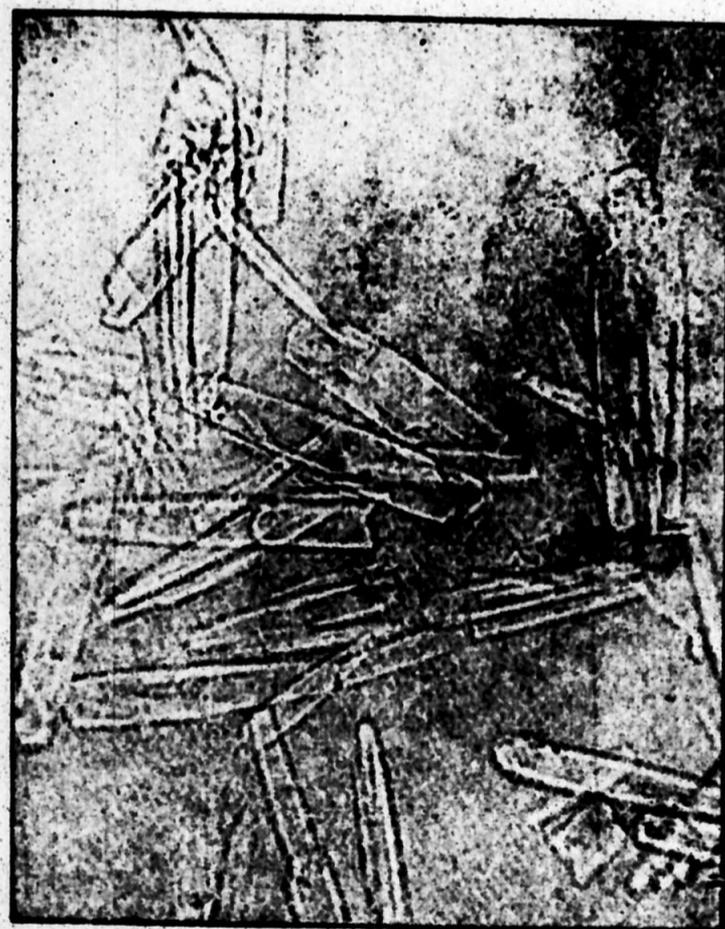
Figur 20.
(Versuch Nr. 1.)



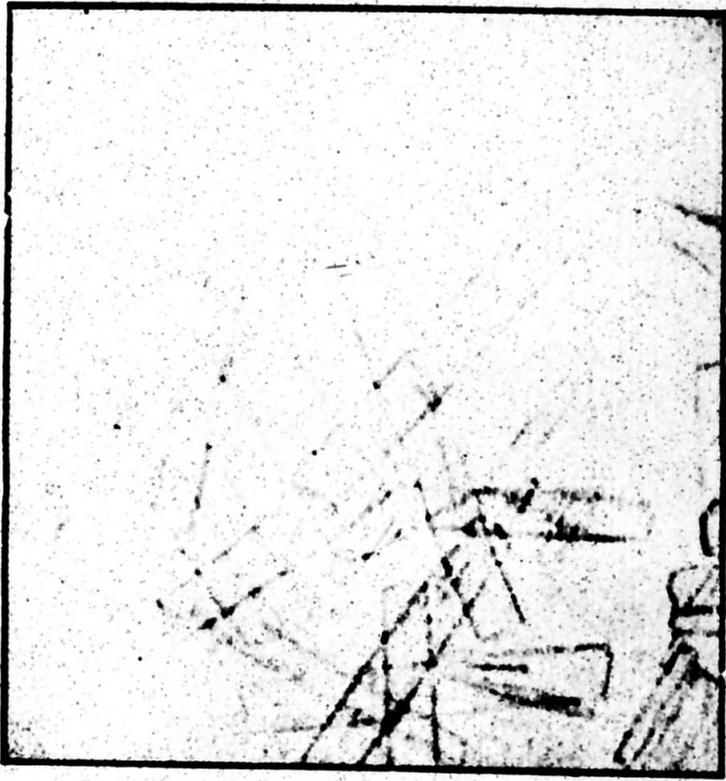
Figur 21.
(Versuch Nr. 2.)



Figur 22.
(Versuch Nr. 3.)



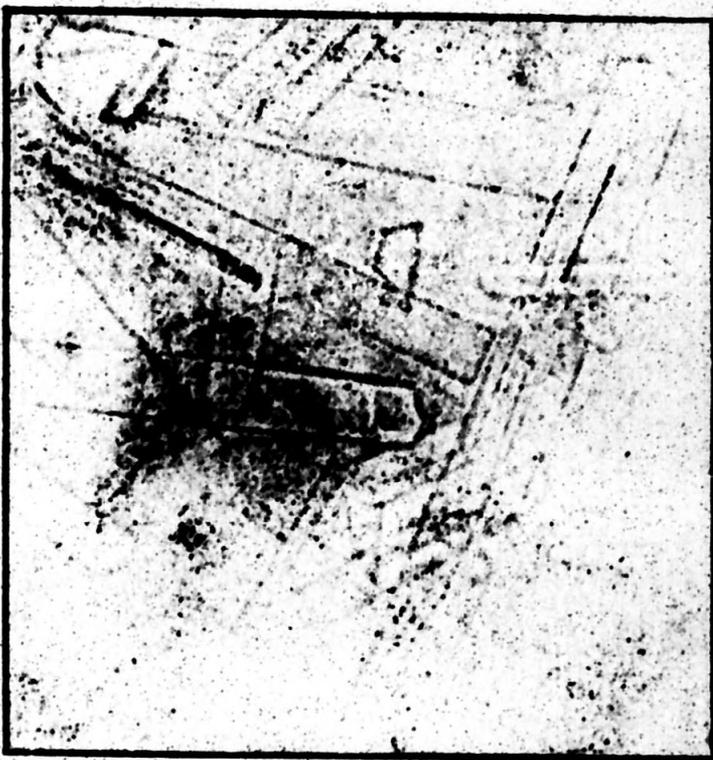
Figur Nr. 23.
(Versuch Nr. 4.)



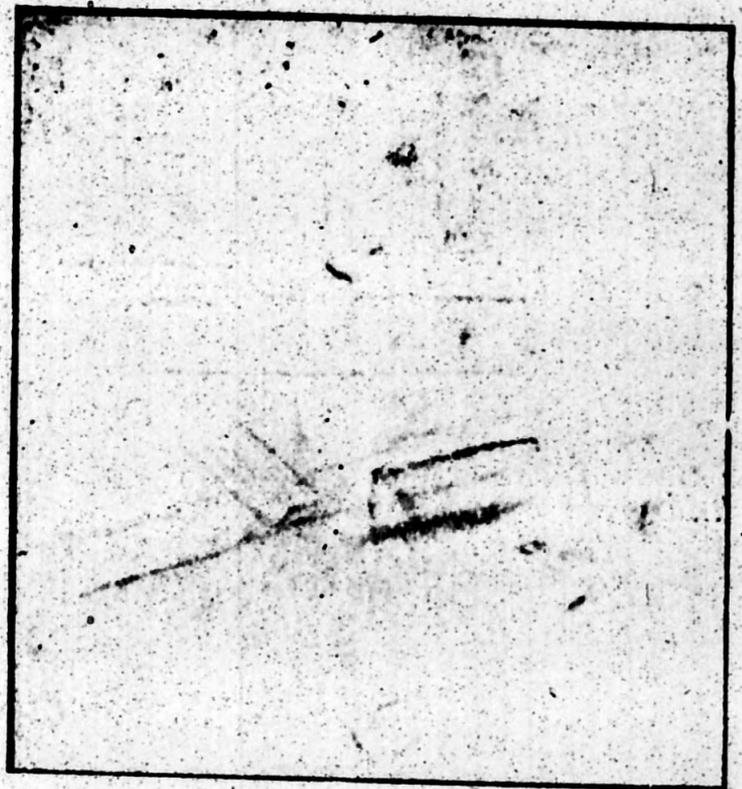
Figur 18 a.



Figur 18 b.



Figur 19 a.



Figur 19 b.