

Proteinstudien.¹⁾

IV. Mitteilung.

Über den Gleichgewichtszustand zwischen dem auskrystallisierten Eieralbumin und der dasselbe umgebenden Mutterlauge und über die Anwendbarkeit der Gibbs'schen Phasenregel auf solche Systeme.

Von

S. P. L. Sørensen und Margrethe Höyrup.

Mit fünf Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juni 1918.)

Die erste systematische Untersuchung des Gleichgewichts zwischen krystallisiertem Eieralbumin und der ammoniumsulfathaltigen Mutterlauge desselben verdanken wir G. Galeotti und seinen Mitarbeitern, welche in einer Reihe Arbeiten den Gleichgewichtszustand zwischen Eiweißstoffen und Elektrolyten studiert haben.²⁾

In der dritten der zitierten Abhandlungen behandelt Galeotti das System: Eieralbumin, Ammoniumsulfat und Wasser. Das zu den Versuchen benutzte Eieralbumin wurde durch Ausfällen mittels Ammoniumsulfats, Lösen und wiederholtes Ausfällen gereinigt; diese Operationen wurden ein paarmal wiederholt, von irgend einer Krystallisation war aber nicht die Rede, und das Eieralbumin Galeottis hat deshalb gewiß eine

¹⁾ Wird gleichzeitig in englischer Sprache in den Comptes-Rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Bd. 12, S. 213 (1915—17) veröffentlicht.

²⁾ G. Galeotti, Diese Zeitschr., Bd. 40, S. 492 (1903); Bd. 42, S. 330 (1904); Bd. 44, S. 461 (1905); G. Guerrini, ibidem, Bd. 47, S. 287 (1906); G. Galeotti, ibidem, Bd. 48, S. 473 (1906); S. La Franca, ibidem, Bd. 48, S. 481 (1906) und V. Scaffidi, ibidem, Bd. 52, S. 42 (1907).

reichliche Menge Konalbumin enthalten. Das solchermaßen gereinigte, ammoniumsulfathaltige Eieralbumin wurde in Wasser gelöst, und die Lösung in einer Schale über konzentrierte Schwefelsäure gestellt, bis eine reichliche Krystallisation vom Eieralbumin stattgefunden hatte, wonächst man filtrierte und einen Teil des Filtrats analysierte. Der Rest des Filtrats wurde, nach Zusatz von Wasser und Ammoniumsulfatlösung, zu weiterer Krystallisation dahingestellt. Wenn letztere hinlänglich vorgeschritten war, wurde nochmals filtriert und ein Teil des Filtrats analysiert, während der Rest nach erneuertem Zusatz von Wasser und Ammoniumsulfat wieder der Krystallisation überlassen wurde, usw.

Die Analysen wurden in der Weise gemacht, daß man abgemessene oder abgewogene Mengen des Filtrats einengte, bei 100° bis auf konstantes Gewicht trocknete und den trocknen Rückstand mit warmem Wasser behandelte, welche Behandlung nur das Eieralbumin ungelöst zurückließ. Die Menge desselben konnte dann mittels Filtrierens durch einen vorweg getrockneten und gewogenen Filter, Waschens und nachfolgenden Trocknens bis auf konstantes Gewicht ermittelt werden: den Gehalt des Filtrats an Ammoniumsulfat bestimmte man durch Fällern mit Baryumchlorid, und schließlich wurde die Wassermenge als Differenz gefunden. In solcher Weise konnte Galeotti die Zusammensetzung derjenigen Mutterlauge berechnen, welcher in jedem einzelnen Fall bei der Versuchstemperatur (15°) mit dem auskrystallisierten Eieralbumin im Gleichgewicht war.

Galeotti geht jetzt davon aus, daß das System bei einer gegebenen Temperatur und einer gegebenen Ammoniumsulfatkonzentration vollständig bestimmt ist. Diese Auffassung steht im vollem Einklang mit der Gibbs'schen Phasenregel, laut welcher ein aus drei Komponenten und drei Phasen bestehendes System bei einer gegebenen Temperatur und einer gegebenen Konzentration einer der Komponenten völlig bestimmt ist. Anders liegt die Sache betreffs der von Guerrini ausgeführten Versuche, die in der vierten der oben zitierten Abhandlungen mitgeteilt sind. Dieser Forscher findet nämlich, daß eine Lösung

von Eieralbumin und Natriumsulfat, welche sowohl mit ausgefälltem Eieralbumin als auch mit dem Dekahydrat des Natriumsulfats im Gleichgewicht steht, bei einer gegebenen Temperatur eine variable Zusammensetzung besitzen kann.

Wir werden nicht näher auf die Betrachtungen eingehen, welche von V. Henri¹⁾ und G. Galeotti²⁾ angestellt worden sind, und laut welcher die Gibbs'sche Phasenregel für kolloide Lösungen keine Gültigkeit hat. Diese Betrachtungen haben ihre Berechtigung, wenn von suspensoiden Systemen die Rede ist; Eieralbuminlösungen aber werden — wie es in den vorhergehenden Abhandlungen mehrere Male hervorgehoben worden ist — am leichtesten und natürlichsten als echte Lösungen eines sehr zusammengesetzten Ampholyten aufgefaßt.

Eine solche Auffassung verlangt indessen, daß die den echten Lösungen gegenüber gültige Gibbs'sche Phasenregel auch für Eieralbuminlösungen Gültigkeit behält. Daß dem wirklich so ist, scheint uns aus den in der gegenwärtigen Abhandlung beschriebenen Versuchen hervorzugehen, und wenn die Resultate Galeottis und seiner Mitarbeiter bisweilen damit nicht im Einklang stehen, so läßt dieses sich leicht erklären. Galeotti setzt nämlich immer voraus, daß es sich z. B. bei der Fällung einer Eieralbuminlösung mittels Ammoniumsulfats um ein aus drei Komponenten — Wasser, Ammoniumsulfat und Eieralbumin — bestehendes System handelt; dies trifft indessen, wie es aus unseren früheren Abhandlungen hervorgeht, nur in ganz vereinzelt Fällen zu. Das angewandte Ammoniumsulfat wird gewöhnlich nicht Ammoniak und Schwefelsäure in äquivalenten Mengen, sondern einen kleinen Überschuß von dem einen oder der anderen enthalten, und dasselbe gilt von einer durch Umfällung oder durch Umkrystallisation, auch gar mit nachfolgender Dialyse, gereinigten Eieralbuminlösung. Eben diese kleinen überschüssigen Mengen von Schwefelsäure oder Ammoniak, deren Gegenwart dargetan und deren Größe durch Wasserstoffionenmessungen ermittelt werden kann,

¹⁾ Zeitschrift für physik. Chemie, Bd. 51, S. 31 (1904).

²⁾ Zeitschrift für physik. Chemie, Bd. 54, S. 727 (1906).

sind es aber, die den Eigenschaften und Reaktionen der Eieralbuminlösungen gegenüber von ausschlaggebender Bedeutung sind. Daß dieser Umstand auch für den Gleichgewichtszustand zwischen dem auskrystallisierten Eieralbumin und der dasselbe umgebenden Mutterlauge von wesentlicher Bedeutung ist, geht mit größter Deutlichkeit aus den im folgenden beschriebenen Versuchen hervor. Hierin ist nichts Sonderbares, selbstverständlich muß aber auch diese Seite der Sache mit in Betracht gezogen werden, wenn davon die Rede wird, inwieweit die Gibbs'sche Phasenregel auf die hier erwähnten Systeme Anwendung finden kann oder nicht. Die Zahl der Komponenten des Systemes wird nämlich, wenn auf das oben genannte Verhältnis Rücksicht genommen wird, nicht drei, sondern vier, und laut der Phasenregel besitzt ein aus vier Komponenten und drei Phasen bestehendes System drei Freiheitsgrade. Das bedeutet, anders gesagt, daß ein System, welches aus krystallisiertem Eieralbumin im Gleichgewicht mit der umgebenden Mutterlauge besteht, bei einer gegebenen Temperatur erst dann vollständig bestimmt ist, wenn die Konzentrationen von zwei der Komponenten des Systems gegeben sind. Damit in gutem Einklang, haben wir bei den im folgenden mitgeteilten Untersuchungen gefunden, daß, wenn die Auskrystallisation des Eieralbumins bei einer gegebenen Temperatur und bei einer gegebenen Konzentration des Ammoniumsulfats und der Wasserstoffionen stattfindet, dann wird die mit den Krystallen in Gleichgewicht stehende Mutterlauge immer, innerhalb der Versuchsfehler, denselben Eieralbumingehalt besitzen.

Wie es schon in der vorhergehenden Abhandlung¹⁾ erwähnt ist, meint Galeotti aus seinen Versuchen schließen zu können, daß das auskrystallisierte Eieralbumin weder Ammoniumsulfat noch Wasser enthält. Dieser, nach unseren in der betreffenden Abhandlung erwähnten Versuchen gewiß fehlerhafte Schluß bleibt indessen auf die Beantwortung derjenigen Fragen, mit welchen sich Galeotti und seine Mitarbeiter sonst

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 214 u. f. (1918).

beschäftigen, ohne Einfluß. Dagegen bedeutet dieser Umstand viel für das Verständnis einer anderen Frage, auf deren Lösung eine Reihe von Forschern im Laufe der Zeiten gearbeitet hat, nämlich die Frage über den Einfluß der Proteinkonzentration auf den Gleichgewichtszustand bei dem Aussalzen. Wenn die Phasenregel auf die hier erwähnten Systeme Anwendung finden kann, dann muß der Gleichgewichtszustand selbstverständlich von der Anfangskonzentration des Proteins unabhängig sein. Aus einer starken Eieralbuminlösung müssen durch Zusatz z. B. von Ammoniumsulfatlösung reichliche, aus einer schwachen Eieralbuminlösung dagegen nur kleine Mengen von Eieralbumin ausfallen oder auskrystallisieren, die in der Lösung zurückbleibende Eieralbuminmenge aber muß in beiden Fällen dieselbe sein, wenn die Umstände übrigens dieselben sind, und das heißt besonders, wenn die Temperatur, die Ammoniumsulfatkonzentration und die Wasserstoffionenkonzentration in beiden Fällen die gleichen sind.

Nach der landläufigen Auffassung verhalten sich indessen die Proteinlösungen nicht so, wie die Phasenregel es verlangt, indem man meint, daß der Proteinstoff unter sonst gleichen Umständen um so vollständiger ausgesalzen wird, je größer die Anfangskonzentration des Proteinstoffs in der Lösung ist. Es ist nicht vonnöten, auf die ganze vorliegende, diesbezügliche Literatur einzugehen, wir können uns damit begnügen, die Frage durch ein einzelnes Beispiel zu beleuchten. Wir haben dazu die schöne Arbeit von Harriette Chick und C. J. Martin¹⁾ über die Fällung des Eieralbumins mittels Ammoniumsulfats gewählt, weil es sich hier um Versuchsbedingungen handelt, die gewiß analog mit denjenigen sind, unter welchen unsere Versuche ausgeführt sind. Chick und Martin untersuchen in einer Versuchsreihe, deren Einzelheiten im experimentellen Teil dieser Abhandlung (s. S. 309) mitgeteilt werden, welchen Einfluß die Anfangskonzentration des Proteinstoffes auf die Fällung des Eieralbumins mittels Ammoniumsulfats ausübt. In den gesamten Versuchen der Reihe war das Verhältnis zwischen Wasser und Ammoniumsulfat konstant und

¹⁾ Biochemical Journal, Bd. 7, S. 380 (1913).

zwar 31 : 100, die Albuminmenge aber variierte in den einzelnen Versuchsmischungen von 3,3 g bis 27,4 g Eieralbumin auf 100 g Wasser. Chick und Martin finden jetzt, daß das Eieralbumin in diesen Versuchen um so vollständiger gefällt wird, je größer die Anfangskonzentration ist. Der Fehler steckt darin, daß Chick und Martin es als eine gegebene Sache betrachtet haben, daß das Verhältnis zwischen Ammoniumsulfat und Wasser sich während des Fällens nicht geändert hat, und deshalb den Ammoniumsulfatgehalt der Filtrate nicht bestimmt haben. Es ist indessen, unserer Meinung nach, kaum ein Zweifel darüber, daß sich bei dieser Fällung gleich wie bei der Auskrystallisation ein wasserhaltiges Eieralbumin ausscheidet, und daß demgemäß das Verhältnis zwischen Ammoniumsulfat und Wasser im Filtrat ein anderes als in der ursprünglichen Mischung ist. Ist man hierüber erst im klaren, so wird es unmittelbar einleuchtend sein, daß, je größer die anfängliche Konzentration des Eieralbumins ist, um so mehr Wasser wird durch die Fällung von der Lösung weggenommen und desto größer wird deshalb die Ammoniumsulfatkonzentration des Filtrats sein. Da nun eine Vergrößerung der Ammoniumsulfatkonzentration eine vollständigere Fällung des Eieralbumins bewirkt, so werden die Versuchsergebnisse von Chick und Martin erklärlich. Wie es im experimentellen Teil (s. S. 255) näher erwähnt wird, haben wir eine Umrechnung dieser Versuchsergebnisse vorgenommen, indem wir vorausgesetzt haben, daß ausgefälltes und auskrystallisiertes Eieralbumin dieselbe Zusammensetzung besitzen; es hat sich dadurch herausgestellt, daß die von Chick und Martin gefundenen, sonderbaren Verhältnisse wahrscheinlich — wie es nach dem oben Angeführten zu erwarten war — lediglich der verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentration der Filtrate zuzuschreiben sind, und dagegen mit der anfänglichen Proteinkonzentration nichts zu tun haben. In gutem Einklang damit steht es dann auch, daß die von uns zur Erläuterung dieser Frage angestellten Versuche zeigen, daß die beim Krystallisieren des Eieralbumins in der Mutterlauge zurückbleibende Albuminmenge von der Anfangs-Proteinkonzentration unabhängig ist, wenn man nur Sorge dafür trägt,

daß die Ammoniumsulfatkonzentration der Mutterlauge beim Abschließen der Krystallisation in sämtlichen Versuchen dieselbe ist, und daß dem wirklich so ist, das muß natürlich auf analytischem Wege dargetan werden.

Hieraus erhellt es, daß sich das oben hervorgezogene Verhältnis ohne jegliche Schwierigkeit erklären läßt und die Anwendung der Phasenregel an solchen Systemen als den von uns untersuchten nicht ausschließt. Es ist nach unserem Dafürhalten in hohem Grade wahrscheinlich, daß dasselbe für viele andere Proteinfällungen gilt, und daß, wenn man bisher die gegenteilige Auffassung gehabt hat, so hat dies seinen Grund in der mangelhaften, experimentellen Bearbeitung der Frage.

Mit den im folgenden beschriebenen Versuchen haben wir denselben Zweck wie in unseren vorhergehenden Abhandlungen verfolgt, und zwar ist es derjenige gewesen zu untersuchen, inwieweit sich Lösungen von Eieralbumin als echte Lösungen verhalten und mit Erfolg als solche betrachtet werden können, und ganz besonders haben wir — wie es schon aus den obigen historischen Bemerkungen hervorgeht — unsere Aufmerksamkeit auf die Frage gerichtet, ob die Gibbs'sche Phasenregel sich solchen Systemen wie den von uns untersuchten gegenüber anwenden läßt. Mit diesem Ziel vor Augen haben wir uns Erläuterungen über den Gleichgewichtszustand zwischen dem auskrystallisierten Eieralbumin und der umgebenden Mutterlauge zu verschaffen gesucht; wir haben aber bei diesen Untersuchungen nicht beabsichtigt ein so erschöpfendes Versuchsmaterial zu beschaffen, daß komplette Diagramme über den Gleichgewichtszustand irgend welcher Krystallisationsbedingungen mittels desselben sich konstruieren ließen. Das würde nämlich, der großen Zahl von Faktoren wegen, welche den Gleichgewichtszustand beeinflussen, ein sehr umfassendes Versuchsmaterial verlangen, und hierzu kommt noch außerdem, daß es, wenn man es mit einem so langsam krystallisierenden Stoff wie Eieralbumin zu tun hat, sehr schwierig ist, einen endlichen und vollständigen Gleichgewichtszustand zu erlangen. Wir haben indessen, was das folgende zeigen wird, gemeint,

das gesteckte Ziel ohne eine ganz erschöpfende Behandlung der Frage erreichen zu können, indem wir uns darüber zu orientieren gesucht haben, welche Bedeutung jeder einzelne der Faktoren sowohl für den Gleichgewichtszustand an sich, als auch für die Geschwindigkeit, mit welcher sich dieser Zustand einstellt, wohl haben möchte. Außerdem haben wir unsere Versuchsanordnung dermaßen zu gestalten angestrebt, daß wir uns auf verschiedene Weisen darüber haben vergewissern können, daß hier die Rede von wirklichen Gleichgewichtszuständen ist, welche sich durch angemessene Änderungen der Krystallisationsbedingungen nach zwei verschiedenen Richtungen hin verschieben lassen.

In den folgenden experimentellen Abschnitten untersuchen wir dann die Bedeutung, welche jeder einzelne Faktor für sich für die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eieralbumins und für das Gleichgewicht zwischen den ausgeschiedenen Krystallen und der umgebenden Mutterlauge haben kann, indem

Abschnitt A die Bedeutung der Ammoniumsulfatkonzentration,

Abschnitt B den Einfluß der Temperatur,

Abschnitt C den der Wasserstoffionenkonzentration und

Abschnitt D die Bedeutung der Proteinkonzentration in obiger Beziehung behandeln werden.

A. Die Bedeutung der Ammoniumsulfatkonzentration für die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eieralbumins und für das Gleichgewicht zwischen den gebildeten Krystallen und der dieselben umgebenden Mutterlauge.

Versuchsreihe a. Bei den 6 Versuchen, welche diese Reihe ausmachen, und welche im Februar 1914 ausgeführt wurden, waren die Versuchsmischungen solchermaßen hergestellt, daß das Verhältnis zwischen Eieralbumin und Wasser konstant war, und zwar etwa 10,5 g Eihydrat auf 100 g Wasser, während der Gehalt an Ammoniumsulfat einzig variierte (von etwa 24 bis 30 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser). Um dies zu erreichen, wogen wir zu jedem Versuch gleich große Mengen einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung von

genau bekannter Zusammensetzung ab und gaben hierzu verschiedene, im voraus berechnete Mengen von Wasser und von einer starken Ammoniumsulfatlösung bekannter Zusammensetzung. Nach geendeter Mischung wurden in jedem Versuch 6 Tropfen Impfungsmaterial zugesetzt, um die Krystallisation einzuleiten. Die Versuchsgemische wurden dann bei Zimmertemperatur (etwa 18°) in konischen, mit Kautschukstöpseln versehenen Kolben unter gutem, täglich zu mehreren Malen wiederholtem Schütteln der Krystallisation überlassen. Nach 4 Tagen Stehenlassen wurde die eine Hälfte jedes Versuchsgemisches filtriert, und nach 13 Tagen die andere. Das Filtrieren geschah mit den in der vorhergehenden Abhandlung¹⁾ erwähnten Vorsichtsmaßregeln, um Verdampfung zu vermeiden, und der zuerst durchgelaufene Teil des Filtrats wurde beseitigt. In abgewogenen Teilen der Filtrate ermittelten wir in der früher beschriebenen Weise²⁾ den Gehalt an Protein- und Ammoniakstickstoff, und die Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate maßen wir elektrometrisch.

Bei der Berechnung der Zusammensetzung, sowohl der der Filtrate als auch der der ursprünglichen Versuchsgemische, haben wir in dieser Abhandlung immer angenommen, daß der gesamte Proteinstickstoff in der Form von Eihydrat, von derselben Zusammensetzung wie die ausgeschiedenen Krystalle vorhanden war, dergestalt, daß das Gewicht des anwesenden Eihydrats durch Multiplikation der Proteinstickstoffmenge mit 7,86³⁾ erhalten werden konnte. Diese Rechnungsweise ist besonders dazu geeignet, die uns hier beschäftigenden Verhältnisse übersichtlich zu gestalten, indem die Ammoniumsulfatkonzentration der Lösung, welche wir in g pro 100 g Wasser angeben, während der Krystallisation dann nicht geändert wird, wenn das Eieralbumin auch in gelöstem Zustande diejenige Wassermenge gebunden hat, mit welcher es später auskrystallisiert.

Zur näheren Erläuterung der Rechnungsweise soll hier die Berechnung einer einzelnen Analyse (Tabelle 39, Versuch Nr. 1, Analyse des

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 219 (1918).

²⁾ I. c. S. 220. ³⁾ I. c. S. 25.

Filtrats nach 4-tägiger Krystallisation) mitgeteilt werden; die Mittelwerte der ausgeführten Stickstoffbestimmungen ergaben, daß 100 g Filtrat enthielten:

9,44 mg Proteinstickstoff, entsprechend,	$0,00944 \cdot 7,86 = 0,074$ g Eihydrat
4,9092 g Ammoniakstickstoff, sulfat entsprechend,	$4,9092 \cdot 4,7163 = 23,153$ g Ammonium-
somit enthielten 100 g Filtrat	<u>76,773 g Wasser</u>
	100,000 g

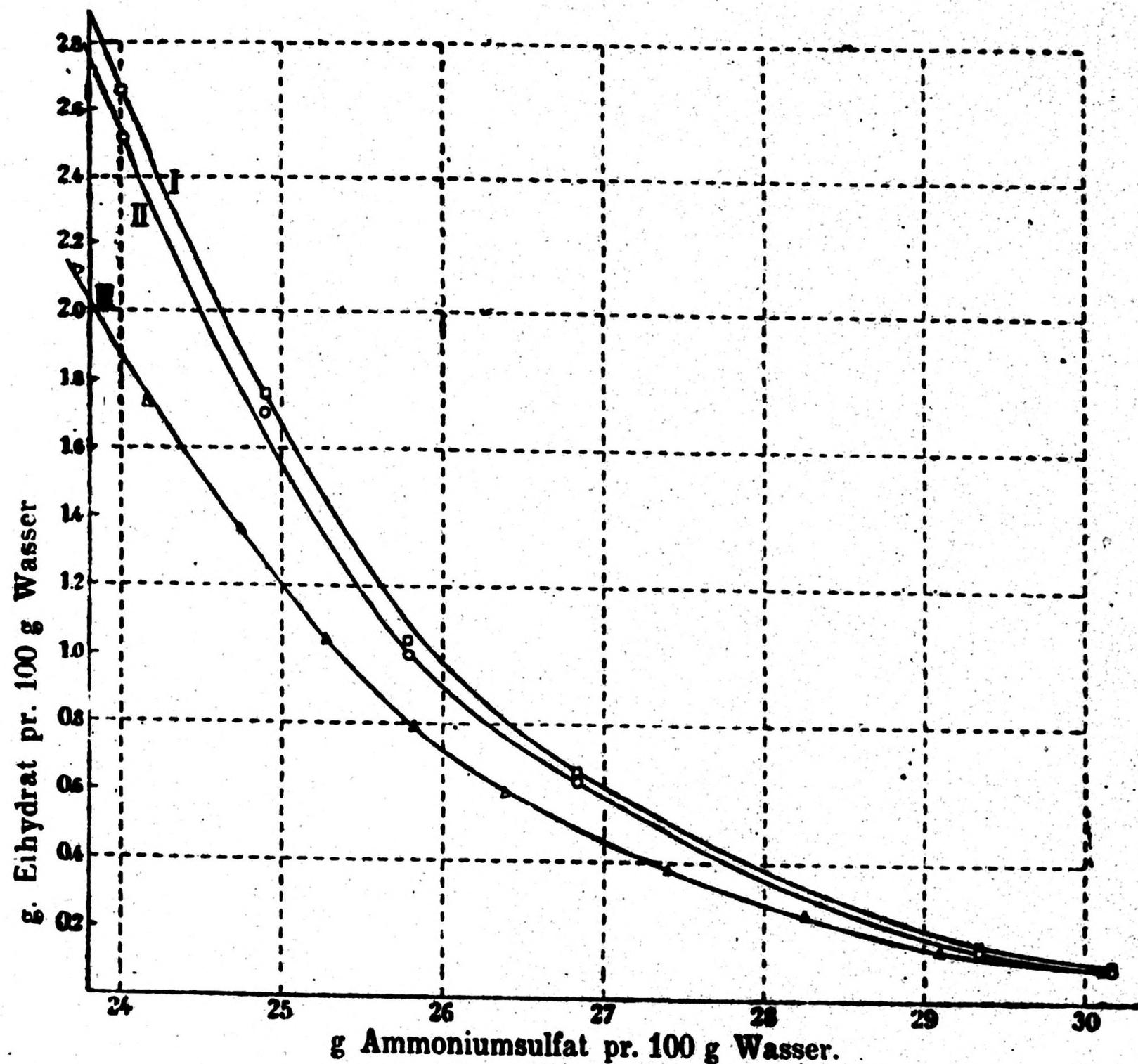
Es fanden sich also auf 100 g Wasser $\left\{ \begin{array}{l} 0,096 \text{ g Eihydrat} \\ 30,158 \text{ g Ammoniumsulfat.} \end{array} \right.$

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 39 zusammengestellt und auf der Figur 24 graphisch wiedergegeben, indem der Gehalt der Filtrate an Ammoniumsulfat als Abszisse und derjenige an Eihydrat als Ordinate aufgeführt sind; die Kurve I entspricht der 4-tägigen und die Kurve II der 13-tägigen Krystallisationszeit.

Es erhellt sowohl aus der Tabelle 39, zweitem, sechstem, siebentem und achtem senkrechten Stab, als auch aus den Kurven I und II der Figur 24, daß die Krystallisation — wie es zu erwarten war — desto schneller anfängt und desto schneller und desto vollständiger verläuft, je größer die Ammoniumsulfatkonzentration ist. Die zwei letzten senkrechten Stäbe der Tabelle 39 enthalten Erläuterungen über die Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate, welche durchschnittlich dem $p_H = 4,85-4,86$ entsprechen; die Wasserstoffionenkonzentration steigt mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration ganz schwach an, was davon herrührt, daß die angewandte Ammoniumsulfatlösung ein wenig überschüssige Schwefelsäure enthielt.

Sowohl aus dem Zahlenmaterial der Tabelle 39 als auch aus der graphischen Darstellung desselben geht es deutlich hervor, daß die Krystallisation — besonders was die ammoniumsulfatärmeren Mischungen betrifft — nach 4 Tagen nicht zu Ende gebracht ist, und höchst wahrscheinlich darf man annehmen, daß der endgültige Zustand des Gleichgewichts auch nicht nach 13 Tagen erreicht worden ist. Es würde deshalb von Interesse sein, wenn man den Gleichgewichtszustand von

der entgegengesetzten Seite erreichen oder sich demselben doch wenigstens nähern könnte, also durch reichliche Krystallisation in einer ammoniumsulfatreichen Mischung mit nachfolgender Lösung der ausgeschiedenen Krystalle durch Zusatz von Wasser oder von einer schwachen Ammoniumsulfatlösung; ein solches Verfahren haben wir in der nächsten Versuchsreihe befolgt.



Figur 24.

Versuchsreihe b. Auch in dieser Reihe, welche 10 im Mai 1916 ausgeführte Versuche umfaßt, war das Verhältnis zwischen Eialbumin und Wasser in den einzelnen Versuchsgemischen sehr nahe ein konstantes, und zwar etwa 7,2 g Eihydrat auf 100 g Wasser, und die Versuche wurden ebenfalls bei Zimmertemperatur (etwa 18°) angestellt. Die Versuchsordnung war die folgende:

Tabelle 39.

(Versuchsreihe a. Februar 1914.)

Vor der Krystallisation enthielt jedes Versuchsgemisch in 300 ccm ca. 25 g Eihydrat oder ca. 10,5 g Eihydrat auf 100 g Wasser.

Nr.	Bemerkungen des Ver- suchs	die Krystallisation betreffend	Kry- stallisa- tions- dauer in Tagen	100 g Filtrat ent- hielten		Das Filtrat enthielt dem- nach pr. 100 g Wasser	Ei- hydrat in g	Am- monium- sulfat in g	Mittel d. Ammo- niumsul- fatge- halts in g	Wasserstoff- ionenkonzentra- tion des Filtrats (nach 4 tägiger Krystallisation)	
				Protein- stick- stoff in mg	Am- moniak- stick- stoff in g					h · 10 ⁶	Ph.
1.			4	9,44	4,9092	0,096	30,158	30,177	15,28	4,816	
				8,54	4,9142						0,087
2.			4	15,43	4,7998	0,157	29,307	29,337	14,13	4,850	
				14,32	4,8077						0,146
3.			13	66,14	4,4622	0,663	26,831	26,829	13,96	4,855	
				62,93	4,4529						0,631

Tabelle 39 (Fortsetzung).

Nr. des Ver- suchs	Bemerkungen die Krystallisation betreffend	Kry- stallisa- tions- dauer in Tagen	100 g Filtrat ent- hielten		Das Filtrat enthielt dem- nach pr. 100 g Wasser			Wasserstoff- ionenkonzentra- tion des Filtrats (nach 4 tägiger Krystallisation)	
			Protein- stick- stoff in mg	Am- moni- stick- stoff in g	Ei- hydrat in g	Am- monium- sulfat in g	Mittel d. Ammo- niumsul- fatge- halts in g	$h \cdot 10^6$	pH.
4.	Die Krystallisation fing im Laufe einer halben Stunde an und wuchs sehr schnell; der Niederschlag zeigte sich unter dem Mikroskop schön krystallinisch.	4 13	114,2	4,3084	1,140	25,793	} 25,784 {	13,52	4,869
			110,6	4,3073	1,103	25,775			
5.	Die Krystallisation fing erst nach einer Stunde, während welcher fleißig geschüttelt wurde, an, und erst nach 5 Std. waren reichliche Mengen Krystalle vorhanden, welche, wie das Mikroskop zeigte, die Form von großen, wohlentwickelten Nadeln hatte.	4 13	177,0	4,1630	1,761	24,861	} 24,886 {	13,46	4,871
			170,3	4,1720	1,695	24,911			
6.	Die Krystallisation fing zwar nach einer Stunde fleißigen Schüttelns an, war aber selbst nach 5 Stunden weit davon entfernt reichlich zu sein. Erst am nächsten Tag war ein großer Niederschlag gebildet, welcher mikroskopisch das Bild von besonders großen und wohlentwickelten Krystallen darbot.	4 13	266,9	4,0207	2,658	24,022	} 24,015 {	12,97	4,887
			252,4	4,0232	2,510	24,007			

2170 g einer Eieralbuminlösung von bekannter Zusammensetzung wurden mit 2157 g einer starken Ammoniumsulfatlösung ebenfalls von bekannter Zusammensetzung, nebst 60 g Wasser und einigen Tropfen Impfungsmaterial versetzt. Die erhaltene Lösung, die sehr bald zu krystallisieren anfang, enthielt auf 100 g Wasser

9,933 g Eihydrat und
28,348 g Ammoniumsulfat.

Nach Stehenlassen über Nacht, wodurch eine reichliche Krystallisation eingetreten war, wurden weitere 413 g der starken Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, wonächst die Masse nach einigen Stunden unter gutem Schütteln dem Krystallisieren überlassen wurde. Aus der solchermaßen erhaltenen Mischung von Krystallen und Mutterlauge, welche Mischung auf 100 g Wasser

9,143 g Eihydrat und
30,128 g Ammoniumsulfat

enthielt, wogen wir 10 Proben, jede von 400 g in konischen mit Kautschukstöpseln verschlossenen Kolben ab, und jede dieser Proben wurde unter sorgfältigem Schütteln und ganz langsam mit 80 ccm einer Ammoniumsulfatlösung, deren Konzentration bei den verschiedenen Versuchen eine verschiedene war, versetzt. Bei Versuch Nr. 1 kam die stärkste Konzentration zur Anwendung, und diese Konzentration war solcherweise bemessen, daß der Gehalt an Ammoniumsulfat in 100 g Wasser dieses Versuchsgemisches durch den Zutat der 80 ccm nicht geändert wurde. Bei Versuch Nr. 10 wurde reines Wasser und bei den zwischenliegenden Versuchen wurden Ammoniumsulfatlösungen zwischenliegender, angemessen ausgewählter Konzentration zugesetzt. Während der ersten Stunde nach der Zutat wurden die Kolben zum wiederholten Male geschüttelt, wonächst ein Drittel jedes Gemisches filtriert wurde; das zweite Drittel wurde am nächsten Tage filtriert, während der Rest erst nach 4 Tagen filtriert wurde. Das Filtrieren geschah wie bei der Reihe a unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln, und die Filtrate wurden analysiert; jedoch bestimmten wir den Ammoniakstickstoff nur im Filtrat von der zweiten

Filtration. Die Ergebnisse der Analysen finden sich in der Tabelle 40.

Es erhellt aus der Tabelle 40, zweitem, drittem und viertem senkrechten Stab, daß der Eihydratgehalt der Filtrate von der ersten bis zur dritten Filtrierung zwar nicht wesentlich geändert wird, jedoch aber immer im dritten Filtrat kleiner ist als im ersten und zweiten. Dieses Sinken des Eihydratgehalts liegt gewöhnlich innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler, in ein paar Fällen ist es jedoch größer und muß dem Umstand zugeschrieben werden, daß es uns nicht gelungen ist die Schwierigkeit ganz zu vermeiden, welche darin liegt, daß ein Zusatz von Wasser oder schwacher Ammoniumsulfatlösung zu einem Brei von Krystallen und Mutterlauge stellenweise, wo die Tropfen eben hinfallen, eine so schnelle und reichliche Lösung der Krystalle bewirken kann, daß die in Lösung gegangene Eieralbuminmenge größer wird als diejenige, die dem Gleichgewichtszustand entspricht. Im großen und ganzen gilt es indessen, daß die Änderungen des Eihydratgehalts von erster bis zu dritter Filtrierung so geringfügig sind, daß wir es hier höchst wahrscheinlich mit einer Konzentration zu tun haben, welche von dem wirklichen Gleichgewichtszustand des Systems jedenfalls nicht weit entfernt ist.

Da nun diese Versuchsreihe bei derselben Temperatur wie die Reihe a ausgeführt ist, und da die Wasserstoffionenkonzentrationen der Filtrate — wie es die zwei letzten senkrechten Stäbe der Tabelle 40 zeigen — von einigermaßen den gleichen Größen¹⁾ wie in der Reihe a sind, so haben wir auf Figur 24 neben den zwei der Versuchsreihe a entsprechenden Kurven (I und II) die Versuchsreihe b wiedergegeben (Kurve III), indem die Zahlen des sechsten und siebenten senkrechten Stabes der Tabelle 40 uns als Koordinaten gedient haben.

¹⁾ Der Mittelwert von p_{H} ist 4,84; im Gegensatz zu dem, was wir in der Versuchsreihe a fanden, ist die Wasserstoffionenkonzentration in der Versuchsreihe b sinkend mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration, was davon herrührt, daß die angewandte Ammoniumsulfatlösung kleine Mengen überschüssiges Ammoniak enthielt.

Tabelle 40 (Versuchsreihe b, Mai 1916).

Alle Versuchsflüssigkeiten enthielten etwa 7,2 g Eihydrat auf 100 g Wasser.

Nr. des Versuchs.	100 g Filtrat enthielten Eihydrat			100 g Filtrat, zweite Filtrierung, enthielten Ammoniumsulfat g	Das zweite Filtrat enthielt somit auf 100 g Wasser		Wasserstoffionenkonzentration des zweiten Filtrats.	
	erste Filtrierung (nach 1 Stunde)	zweite Filtrierung (nach 1 Tag)	dritte Filtrierung (nach 4 Tagen)		Eihydrat g	Ammoniumsulfat g	h · 10 ⁶	p _H
	g	g	g					
1	0,075	0,076	0,072	23,131	0,099	30,121	11,70	4,932
2	0,123	0,118	0,116	22,520	0,153	29,110	12,56	4,901
3	0,190	0,191	0,185	21,996	0,245	28,268	13,49	4,870
4	0,296	0,300	0,288	21,442	0,383	27,399	14,72	4,832
5	0,479	0,467	0,460	20,782	0,593	26,390	15,00	4,824
6	0,630	0,622	0,606	20,393	0,787	25,819	15,70	4,804
7	0,802	0,827	0,790	20,007	1,045	25,272	15,42	4,812
8	1,078	1,079	1,049	19,621	1,361	24,743	15,38	4,813
9	1,376	1,378	1,359	19,199	1,735	24,173	16,56	4,781
10	1,731	1,686	1,672	18,857	2,122	23,732	15,96	4,797

Vergleicht man die drei Kurven der Figur 24 und geht man davon aus, daß Kurve III den Gleichgewichtszustand des Systems darstellt, dann kommt man zu dem Schluß, der schon oben (siehe S. 276) angedeutet worden ist, daß die Krystallisation in der Versuchsreihe a selbst nach 13 Tagen nicht vollständig beendet ist, und daß der Zustand des Systems desto mehr vom Gleichgewicht abweicht, je kleiner die Ammoniumsulfatkonzentration ist.¹⁾

¹⁾ Bei obigem Vergleich der Kurven I, II und III haben wir davon abgesehen, daß die Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate nicht in allen Versuchen ganz dieselbe ist, ja, nicht einmal immer in korrespondierenden Versuchen der beiden Reihen dieselbe ist. Es geht aus den Tabellen 39 und 40 hervor, daß bei größeren Ammoniumsulfatkonzentrationen die Filtrate von der Reihe a eine größere Wasserstoffionenkonzentration als diejenige von b haben, während das Verhältnis bei niedrigen Ammoniumsulfatkonzentrationen das umgekehrte ist.

Mittels der im Abschnitt C beschriebenen Versuche über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für den Gleichgewichtszustand,

Die oben beschriebenen zwei Versuchsreihen haben somit gezeigt, daß die Auskrystallisation des Eihydrats so langsam von statten geht, besonders bei schwachen Ammoniumsulfatkonzentrationen, daß es kaum möglich ist, einen wirklichen Gleichgewichtszustand auf diesem Wege innerhalb einer passenden Zeit zu erreichen. Dieser Schluß ist natürlich nur dann stichhaltig, wenn die beiden Versuchsreihen a und b wirklich mit einander verglichen werden können, daß wir also, anders gesagt, in diesen Reihen, die mit einem Zwischenraum von zwei Jahren und mit zwei verschiedenen Eieralbuminlösungen angestellt worden sind, wirklich mit demselben Stoff gearbeitet haben, und daß demzufolge der Gleichgewichtszustand in beiden Reihen derselbe sein muß.

Als Stütze der obigen Deutung unserer Versuchsergebnisse werden wir deshalb noch eine Versuchsreihe, c, mitteilen, in welcher wir eine dritte Eieralbuminlösung in der Weise benutzten, daß wir in einigen Versuchen direkte Ankrystallisation wie in der Versuchsreihe a, während wir in anderen das Verfahren der Reihe b benutzten. Da es auch bei diesen mit derselben Eieralbuminprobe angestellten, unten näher beschriebenen Versuchen sich als unmöglich zeigte, einen wirklichen Gleichgewichtszustand durch direkte Auskrystallisation zu erreichen, während dies durch das unter Versuchsreihe b beschriebene Verfahren zu erlangen war, so sehen wir keinen Grund dazu, eine andere Erklärung der in den Reihen a und b erhaltenen Ergebnisse als die obige zu suchen.

Versuchsreihe c. Diese Reihe bestand aus 5 Ver-

kann man sich einen Begriff davon machen, welches das Resultat der Versuchsreihe b gewesen sein würde, wenn die Filtrate dieser Reihe dieselbe Wasserstoffionenkonzentration gehabt hätten, wie die Filtrate entsprechender Ammoniumsulfatkonzentrationen der Reihe a. Benutzt man die solcherweise korrigierten Versuchsergebnisse zur Konstruktion der Kurve III, so stellt es sich heraus, daß diese Kurve bei den stärkeren Ammoniumsulfatkonzentrationen ein wenig niedriger und bei den niedrigeren Ammoniumsulfatkonzentrationen ein wenig höher ausfällt als auf Fig. 24 gezeigt, die Verschiebungen sind aber so klein, daß sie in dem obigen Gesamtbild der Versuchsergebnisse nichts ändern können.

suchen, welche im November 1914 angestellt wurden. Die Versuchstemperatur war die des Zimmers (18°) und es wurde bei den Versuchen angewandt:

α) eine Eieralbuminlösung, die auf 100 g Wasser

30,679 g Eihydrat und

16,767 g Ammoniumsulfat enthielt;

β) eine starke Ammoniumsulfatlösung, die auf 100 g Wasser 33,090 g Ammoniumsulfat enthielt und

γ) eine schwache Ammoniumsulfatlösung, die auf 100 g Wasser 16,120 g Ammoniumsulfat enthielt.

Jedes der 5 Versuchsgemische enthielt 200 ccm der Eieralbuminlösung, wozu kamen in

Nr. 1: 300 ccm starke Ammoniumsulfatlösung + 10 Tropfen Impfungsmaterial.

Nr. 2: ganz wie Nr. 1, nach 2-tägiger Krystallisation aber wurden 100 ccm schwache Ammoniumsulfatlösung zugegeben.

Nr. 3: ganz wie Nr. 1, nach 2-tägiger Krystallisation aber wurden 200 ccm schwache Ammoniumsulfatlösung zugegeben.

Nr. 4: zu der Eieralbuminlösung wurden sofort 100 ccm schwache und danach 300 ccm starke Ammoniumsulfatlösung nebst 10 Tropfen Impfungsmaterial gegeben.

Nr. 5: ganz wie Nr. 4, nur wurden nicht 100, sondern 200 ccm der schwachen Ammoniumsulfatlösung zugegeben.

Hieraus ersieht man, daß die Versuchsgemische Nr. 2 und Nr. 4 dieselbe Zusammensetzung hatten, und das gleiche war mit Nr. 3 und Nr. 5 der Fall. Die Versuchsanordnung war indessen eine verschiedene, indem das in der Versuchsreihe a gebrauchte Verfahren bei Nr. 4 und Nr. 5 benutzt wurde, während Nr. 2 und Nr. 3 wie unter Versuchsreihe b beschrieben ausgeführt wurden. Was schließlich Nr. 1 betrifft, so wurde dieser Versuch hauptsächlich gemacht, um zu konstatieren, wie weit die Krystallisation in Nr. 2 und Nr. 3 nach zwei Tagen, vor dem Zusatz der schwachen Ammoniumsulfatlösung, vorgeschritten war. Zu angemessenen Zeiten wurden aus den Versuchsgemischen Proben herausgenommen, welche in

derselben Weise wie bei den Versuchsreihen a und b filtriert und analysiert wurden.

Die erste Probenahme geschah, nachdem alle 5 Versuchsgemische 2 Tage der Krystallisation überlassen gewesen waren, die schwache Ammoniumsulfatlösung den Gemischen Nr. 2 und Nr. 3 zugegeben war, und diese letzteren unter wiederholtem Schütteln 1 Stunde gestanden hatten. 4 Stunden später wurden wieder Proben aus Nr. 2 und 3 genommen, nicht aber aus den übrigen, was auch der dritten Probenahme galt, welche am folgenden Tag stattfand. Dagegen wurden bei den späteren Filtrierungen Proben aus sämtlichen Versuchsgemischen genommen. Die Analyseresultate sind in der Tabelle 41 zusammengestellt.

Betreffs des in der Tabelle 41 zusammengestellten Zahlenmaterials ist vorerst zu bemerken, daß die eingeklammerten Zahlen des siebenten senkrechten Stabes, welche den Eihydratgehalt von 100 g Filtrat nach 6-wöchentlicher Krystallisation angeben, nur mitgenommen sind, um ein Verhältnis zu beleuchten, welches wir bei Untersuchungen dieser Art bisweilen angetroffen haben.

Es zeigt sich oft, aber nicht immer, daß sich das auskrystallisierte Eieralbumin in Mischungen von Niederschlag und umgebender Mutterlauge durch hinlänglich langes Stehenlassen bei Zimmer- oder höherer Temperatur nach und nach wieder löst, dermaßen, daß der Eihydratgehalt der Mutterlauge, statt abzunehmen, vielmehr wächst. Wir hegen keinen Zweifel, daß es sich hier um einen bakteriellen Prozeß handelt, wodurch krystallisierbares Eieralbumin in eine nicht krystallisierbare, leichter lösliche Verbindung verwandelt wird. Diese Verwandlung bezeichnet, wie wir schon in einer früheren Abhandlung¹⁾ bemerkt haben, wahrscheinlich die erste Stufe des Abbaus des krystallisierbaren Eieralbumins und ist mutmaßlich von nicht sehr tiefgreifender Art, denn das gebildete, nicht krystallisierbare Eieralbumin koaguliert gleichwie das krystallisierbare, und es entstehen bei der Umbildung nur ganz winzige Mengen nicht koagulierbarer Verbindungen.

¹⁾ Diese Zeitschr.. Bd. 103, S. 44.

Sieht man nun von den Zahlen des siebenten senkrechten Stabes ab, dann zeigt die Tabelle 41, daß, während in den Versuchen Nr. 2 und Nr. 3, wo eine Wiederauflösung schon auskrystallisierten Niederschlages stattgefunden hat, ein wirklicher Gleichgewichtszustand erreicht worden ist, so ist dieses, was die übrigen Versuche betrifft, bei welchen das direkte Krystallisationsverfahren angewandt wurde, nicht der Fall. Im Versuch Nr. 1, wo die Ammoniumsulfatkonzentration stark ist, tritt dieses Verhältnis nicht deutlich hervor, in den Versuchen Nr. 4 und 5 aber ist das Sinken des Eihydratgehalts der Filtrate während der Krystallisation deutlich und nicht zu verneinen.

Man ersieht ebenfalls, daß, obschon der Ammoniumsulfatgehalt (zehnter senkrechter Stab) in den Versuchen Nr. 2 und 4 bzw. Nr. 3 und 5 derselbe ist, so ist jedoch der Eihydratgehalt um ein bedeutendes geringer in Nr. 2 und Nr. 3 als in den entsprechenden Versuchen mit direkter Krystallisation und das dem ungeachtet, daß es dieselbe Eieralbuminlösung ist, welche bei sämtlichen Versuchen angewandt ist. Die qualitativen Verhältnisse dieser Versuchsreihe entsprechen also ganz denjenigen, die wir bei den beiden ersten Reihen fanden, und es wird deshalb von Interesse sein zu sehen, ob die Übereinstimmung der Resultate der drei Versuchsreihen noch weiter geht.

Wir betrachten zuerst die Versuche direkter Krystallisation (Reihe c Nr. 1, Nr. 4 und Nr. 5), welche also mit der Versuchsreihe a zu vergleichen sind. Da die Werte des Eihydratgehalts, Tabelle 41, neunter und zehnter Stab, einer zusammengenommenen 5-tägigen Krystallisation entsprechen, wird es das natürlichste sein, die Kurve I der Figur 24 zum Vergleich heranzuziehen, weil diese Kurve einer Krystallisationszeit von 4 Tagen entspricht. Der Kurve I kann man jetzt ablesen, welchen Eihydratgehalt das Filtrat haben muß, wenn der Ammoniumsulfatgehalt derjenige ist, welcher im Versuch Nr. 1, bzw. Nr. 4 oder Nr. 5 (Versuchsreihe c) gefunden wurde, und wenn die beiden Reihen a und c direkt verglichen werden können. Eine solche Ablesung der Kurve I gibt in-

dessen weit größere Zahlen als die in der Tabelle 41, neuntem Stab aufgeführte. Das rührt davon her, daß die beiden Versuchsreihen nicht direkt zu vergleichen sind, weil die Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate der Reihe c — wie aus den beiden letzten Stäben der Tabelle 41 hervorgeht — weit größer (und zwar dem $p_{H^+} = \text{ca. } 4,66$ entsprechend) ist als diejenige der Reihe a (wo p_{H^+} durchschnittlich $4,85-4,86$ ist). Hieraus folgt indessen, wie in einem folgenden Abschnitt (s. S. 299) gezeigt wird, daß der Eihydratgehalt der Filtrate der Versuchsreihe c kleiner als der der Kurve I abgelesene sein soll. Weiter kann man mittels der Kurven, welche die Abhängigkeit der bei der Krystallisation in der Mutterlauge zurückbleibenden Menge Eihydrat von der Wasserstoffionenkonzentration graphisch wiedergeben (Fig. 26, S. 305), schätzen, daß das Filtrat bei einer Wasserstoffionenkonzentration, welche $p_{H^+} = 4,66$ entspricht, nur 68 Prozent derjenigen Menge Eihydrat enthält, welche unter sonst gleichen Umständen in einem Filtrat mit einer Wasserstoffionenkonzentration, welche dem $p_{H^+} = 4,85$ entspricht, vorhanden ist. Multipliziert man deshalb die der Kurve I abgelesenen Zahlen mit 0,68, so bekommt man Werte der Eihydratmenge der Filtrate entsprechend, welche mit der in der Tabelle 41, neuntem Stab angeführten, innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler, zusammenfallen sollen. Die solchermaßen der Kurve I abgelesenen und sodann mit 0,68 multiplizierten Zahlen sind im elften Stab der Tabelle 41 aufgeführt.

In ganz derselben Weise sind die Versuche Nr. 2 und Nr. 3 (Versuchsreihe c) mit der Versuchsreihe b verglichen, und von ganz entsprechenden Betrachtungen, wie die oben angeführten, ausgehend, sind die der Kurve III direkt abgelesenen Werte des Eihydratgehalts mit 0,77 multipliziert worden, wonächst die solchermaßen erhaltenen, korrigierten Werte ebenfalls im elften Stab der Tabelle 41 aufgeführt sind.

Vergleicht man jetzt die Zahlen des neunten und elften Stabes der Tabelle 41 unter einander, so findet man eine so schöne Übereinstimmung, wie man es nach den vorliegenden Umständen nur erwarten darf, und wir meinen uns deshalb

berechtigt, den Schluß zu ziehen, daß sich die drei verschiedenen Eieralbuminlösungen bei den hier erwähnten Versuchen in derselben Weise verhalten haben.

B. Die Bedeutung der Temperatur für die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eieralbumins und für den Gleichgewichtszustand zwischen dem ankrystallisierten Niederschlag und der umgebenden Mutterlauge.

Versuchsreihe d. Unter den 6 dieser Reihe angehörigen Versuchen, welche im September 1914 ausgeführt wurden, hatten die 3 (mit R, S und T bezeichnet) die gleiche Ammoniumsulfatkonzentration (27,220 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser), während die anderen 3 (mit r, s und t bezeichnet) eine etwas niedrigere Konzentration (26,007 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser) besaßen. Die Temperatur der Krystallisation war für R und r 0° (die Kolben standen in Eis im Eisschrank), für S und s 12° (Panums Thermostat) und für T und t 24° (Panums Thermostat). Übrigens war die Versuchsanordnung die gewöhnliche, bei der Versuchsreihe a beschriebene; für die Analyse der Filtrate wurden Proben nach bzw. 2, 6 und 31 Tagen entnommen.

Die Krystallisation ging in den Versuchen bei 0° nur langsam vonstatten. In R fand sich nach mehreren Stunden nur wenig Niederschlag und derselbe zeigte sich unter dem Mikroskop als runde, amorphe Massen, mit einzelnen Krystallbündeln vermischt; erst nach 2 Tagen war alles amorphes verschwunden, und ein reichlicher, aus schönen nadelförmigen, aber nicht besonders großen Krystallen bestehender Niederschlag vorhanden. In r trat erst nach eintägigem Stehenlassen eine einigermaßen reichliche Menge Krystalle von normalem Aussehen auf.

Bei 12° und besonders bei 24° ging die Krystallisation weit schneller als bei 0° vor sich, und der gebildete Niederschlag war sofort schön krystallinisch.

In vollem Einklang mit dem oben Angeführten gaben die Filtratanalysen, deren Resultate in der Tabelle 42 zusammengestellt sind, daß die Geschwindigkeit der Krystallisation bei 0° bedeutend kleiner als bei 12° und bei

24° ist. Außerdem scheinen die Analysenresultate anzudeuten, daß der Zustand des Gleichgewichts bei 0° von demselben bei den höheren Temperaturen wesentlich verschieden ist, indem die Lösung selbst nach 31 Tagen in den Versuchen bei 0° bedeutend mehr Eihydrat enthält als in den anderen Versuchen. Um dieses, sowie auch andere hierher gehörige Verhältnisse etwas näher zu beleuchten, haben wir die folgende Versuchsreihe angestellt.

Tabelle 42.

(Versuchsreihe d; September 1914.)

Die Versuchsmischungen enthielten in allem ca. 8,6 g Eihydrat auf 100 g Wasser.

Marke des Versuchs	Versuchs- tempera- tur	Das Filtrat enthielt auf 100 g Wasser			
		Ammo- nium- sulfat	Eihydrat		
			bei der ersten Filtrierung (nach 2 Tagen) g	bei der zweiten Filtrierung (nach 6 Tagen) g	bei der dritten Filtrierung (nach 21 Tag.) g
R	0°	27,220	0,815	0,749	0,661
S	12°	27,220	0,474	0,429	0,381
T	24°	27,220	0,406	0,391	0,362
r	0°	26,007	1,712	1,534	1,395
s	12°	26,007	0,956	0,877	0,781
t	24°	26,007	0,805	0,744	0,714

Versuchsreihe e. Diese Reihe, welche im Februar 1915 ausgeführt wurde, bestand aus 12 Versuchen; die Krystallisationstemperaturen waren 0°, 12°, 20° und 29° und es wurden 3 Versuche bei jeder Temperatur gemacht. Diese 3 Versuche wurden nach denselben Prinzipien wie die Versuchsreihe c ausgeführt. Wir benutzten also bei den 3 Versuchen gleich große Mengen (100 ccm) einer Eieralbuminlösung gekannter Zusammensetzung, hierzu wurden beim ersten Versuch sofort 100 ccm einer «starken» Ammoniumsulfatlösung gegeben, und ebenso beim zweiten, hier wurden aber nach einigen Tagen außerdem noch 100 ccm «schwache» Ammoniumsulfatlösung zugefügt; beim dritten Versuch dagegen wurden sofort 100 ccm

krystallisierten zuerst und am reichlichsten, die bei 0° am langsamsten, in allen Fällen aber zeigte sich der gebildete Niederschlag unter dem Mikroskop als ein deutlich krystallinischer.

Dagegen krystallisierten die vier Mischungen, welche sowohl «schwache» als auch «starke» Ammoniumsulfatlösung enthielten, nur langsam, und ganz besonders diejenige bei 0°. Nach einem Tag war reichliche Krystallisation in Nr. 9 und Nr. 12 und einigermaßen reichliche Krystallisation in Nr. 6 eingetreten, während eine ausgesprochene, aber bei weitem nicht reichliche Krystallisation sich erst nach mehreren Tagen in Nr. 3 wahrnehmen ließ.

Die Analysenresultate dieser Versuchsreihe sind in der Tabelle 43 nebst den Zeitpunkten der Probenahmen zusammengestellt; hier soll nur bemerkt werden, daß in denjenigen Versuchen (Nr. 2, Nr. 5, Nr. 8 und Nr. 11), bei welchen «schwache» Ammoniumsulfatlösung nach einigen Tagen zugegeben wurde, um den Gleichgewichtszustand durch Wiederauflösen schon gebildeten Niederschlags zu erreichen, die Probenahme $\frac{1}{2}$ Stunde (erste Filtrierung), 5 Stunden (zweite Filtrierung), 1 Tag (dritte Filtrierung) und 4 Tage (vierte Filtrierung) nach dem Zusatz der «schwachen» Ammoniumsulfatlösung stattfand.

Die Bestimmung der Ammoniakstickstoffmenge wurde in sämtlichen Versuchen nur in einem der Filtrate (vierter Filtrierung) ausgeführt. Bei diesen Bestimmungen fanden sich auf 100 g Wasser in

Nr. 1: 28,211 g Ammoniumsulfat

» 4: 28,227 g »

» 7: 28,265 g »

» 10: 28,230 g »

Mittel: 28,233 g Ammoniumsulfat.

Nr. 2: 24,027 g Ammoniumsulfat

» 3: 24,070 g »

» 5: 24,052 g »

» 6: 24,055 g »

» 8: 24,033 g »

» 9: 24,005 g »

» 11: 24,054 g »

» 12: 24,052 g »

Mittel: 24,044 Ammoniumsulfat.

Aus diesen Zahlenreihen ersieht man, daß die 4 bzw. 8 Versuchsgemische praktisch genommen dieselbe Ammoniumsulfatkonzentration gehabt haben, indem die Abweichungen vom Mittel so klein sind, daß sie sehr wohl von Analysefehlern herkommen können; in der Tabelle 43 sind daher auch nur die Mittelwerte aufgeführt.

Endlich muß noch bemerkt werden, daß nach der vierten Probenahme die Versuchstemperatur in mehreren der Versuche gewechselt wurde. Damit verbanden wir die Absicht zu untersuchen, ob es möglich sein sollte, eine Verschiebung des Gleichgewichts durch Temperaturwechsel hervorzurufen; hierüber geben die 5 untersten wagerechten Reihen der Tabelle Erläuterung.

Wir betrachten zuerst denjenigen Teil der Tabelle 43, welcher die Analysenresultate der vier ersten Filtrate wiedergibt. Dieselben Resultate sind durch die 4 Kurvensysteme der Figur 25 graphisch dargestellt, indem die Krystallisationsdauer in Tagen als Abszisse dient, während der Eihydratgehalt des Filtrats auf 100 g Wasser als Ordinate fungiert.

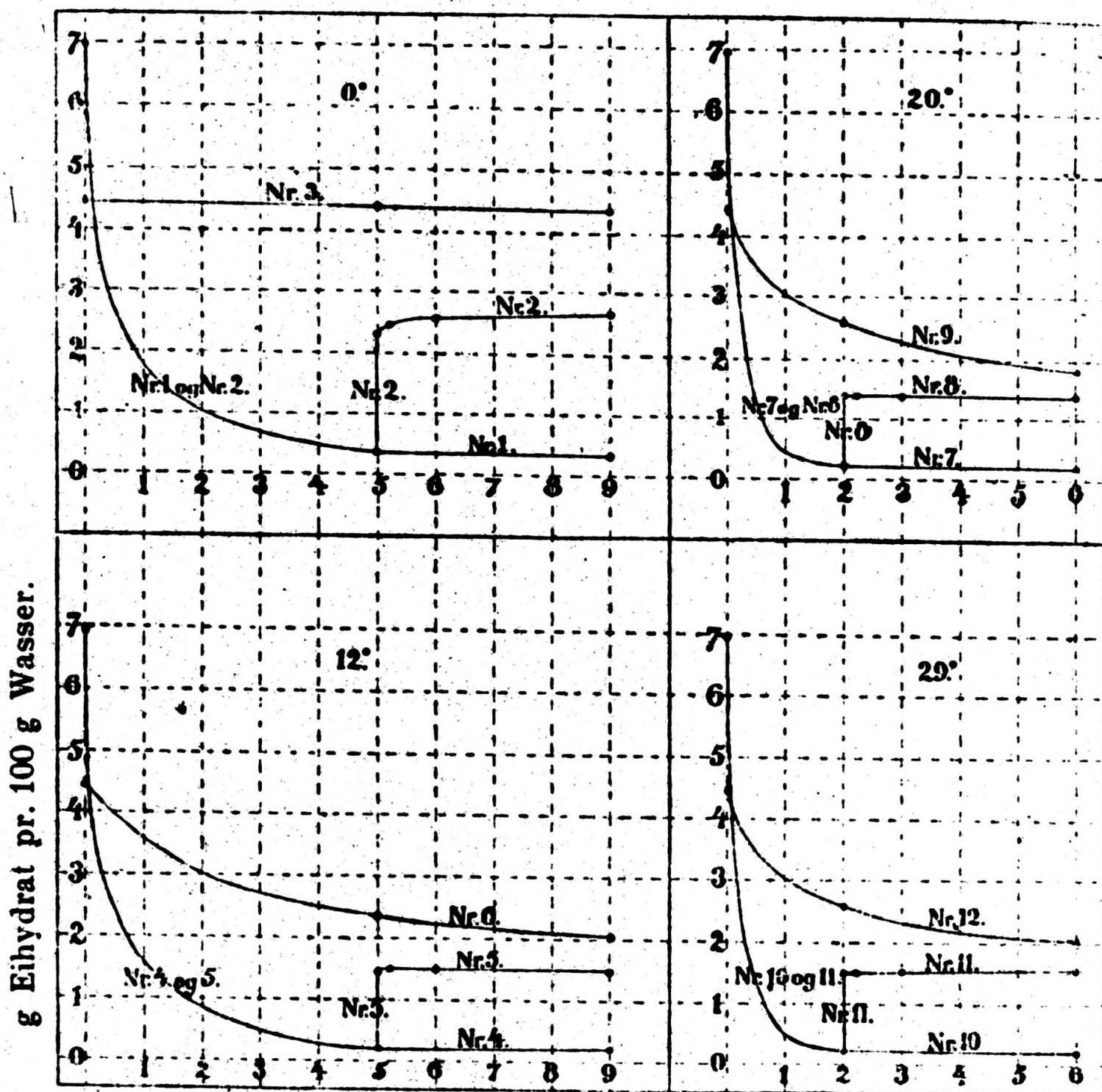
Betrachten wir eins der Kurvensysteme etwas genauer, z. B. dasjenige, welches der Temperatur 20° entspricht und also die Versuche Nr. 7, Nr. 8 und Nr. 9 umfaßt, dann ist die Gestalt der Nr. 7 und Nr. 9 entsprechenden Kurven ohne weiteres verständlich. Schon die Zahlen der Tabelle 43 zeigen es, sehr übersichtlich tritt es aber auf der Figur hervor, daß in Nr. 7 die Krystallisation schon nach 2 Tagen beinahe zu Ende geführt ist, während in Nr. 9, wo die Ammoniumsulfatkonzentration weit geringer ist, dieses noch weit davon entfernt ist der Fall zu sein.

Was den Versuch Nr. 8 betrifft, so ist anzunehmen, daß die Krystallisation während der ersten 2 Tage ganz wie im Versuch Nr. 7 verläuft, sodann wird ja aber Nr. 8 mit der «schwachen» Ammoniumsulfatlösung versetzt, und die Figur zeigt deutlich, wie der Eihydratgehalt der Lösung dadurch vergrößert wird, und wie er schon bei der ersten Probenahme ($\frac{1}{2}$ Stunde später) den maximalen, nahezu konstanten Wert erreicht hat, welcher dem Gleichgewichtszustand unter den ob-

Tabelle 3.
 (Versuchsreihe e Februar 1915).

Nummer des Versuchs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zusammensetzung der Versuchsflüssigkeit.	«starke» ohne «schwache»	«starke» + (nach 5 Tag.) «schwache»	«schwache» + (sofort) «starke»	«starke» ohne «schwache»	«starke» (nach 5 Tag.) «schwache»	«schwache» + (sofort) «starke»	«starke» ohne «schwache»	«starke» + (nach 2 Tag.) «schwache»	«schwache» + (sofort) «starke»	«starke» ohne «schwache»	«starke» + (nach 2 Tag.) «schwache»	«schwache» + (sofort) «starke»
Die Menge des Ammoniumsulfats in g auf 100 g Wasser	28,233	24,044	24,044	28,233	24,044	24,044	28,233	24,044	24,044	28,233	24,044	24,044
Versuchstemperatur	0°	0°	0°	12°	12°	12°	20°	20°	20°	29°	29°	29°
Gehalt von Eihydrat in g auf 100 g Wasser in den Versuchsflüssigkeiten						vor der ersten Filtrierung und in den verschiedenen Filtraten.						
Vor der ersten Filtrierung	6,955	4,467	4,467	6,955	4,467	4,467	6,955	4,467	4,467	6,955	4,467	4,467
Erstes Filtrat (nach Tagen)	0,379 (5 Tagen)	2,293 (5 Tagen + 1/2 Std.)	4,410 (5 Tagen)	0,229 (5 Tagen)	1,489 (5 Tagen + 1/2 Std.)	2,333 (5 Tagen)	0,211 (2 Tagen)	1,419 (2 Tagen 1/2 Stde.)	2,556 (2 Tagen)	0,243 (2 Tagen)	1,529 (2 Tagen + 1/2 Std.)	2,587 (2 Tagen)
Zweites Filtrat (nach Tagen)	—	2,445 (5 Tagen + 5 Std.)	—	—	1,509 (5 Tagen + 5 Std.)	—	—	1,409 (2 Tagen + 5 Std.)	—	—	1,529 (2 Tagen + 5 Std.)	—
Drittes Filtrat (nach Tagen)	—	2,556 (5 + 1 Tg.)	—	—	1,499 (5 + 1 Tg.)	—	—	1,390 (2 + 1 Tg.)	—	—	1,589 (2 + 1 Tg.)	—
Viertes Filtrat (nach Tagen)	0,342 (9 Tagen)	2,566 (5 + 4 Tg.)	4,379 (9 Tagen)	0,217 (9 Tagen)	1,489 (5 + 4 Tg.)	2,030 (9 Tagen)	0,199 (6 Tagen)	1,370 (2 + 4 Tg.)	1,829 (6 Tagen)	0,229 (6 Tagen)	1,600 (2 + 4 Tg.)	2,021 (6 Tagen)
Die n. d. vierten Filtrierung benutzte Versuchstemperat.	0° (wie früh.)	29° (früher 0°)	0° (wie früh.)	12° (wie früh.)	29° (früh. 12°)	12° (wie früh.)	20° (wie früh.)	0° (früh. 20°)	20° (wie früh.)	29° (wie früh.)	0° (früh. 29°)	29° (wie früh.)
Fünftes Filtrat (nach Tagen)	0,336 (15 Tagen)	1,789 (5 + 10 Tg.)	4,347 (15 Tagen)	—	1,689 (5 + 10 Tg.)	1,899 (15 Tagen)	0,187 (15 Tagen)	2,252 (2 + 13 Tg.)	1,680 (15 Tagen)	0,225 (15 Tagen)	2,212 (2 + 13 Tg.)	1,909 (15 Tagen)
Sechstes Filtrat (nach Tagen)	0,318 (22 Tagen)	1,800 (5 + 17 Tg.)	4,253 (22 Tagen)	0,209 (22 Tagen)	1,680 (5 + 17 Tg.)	1,810 (22 Tagen)	0,181 (22 Tagen)	2,202 (2 + 20 Tg.)	1,589 (22 Tagen)	0,224 (22 Tagen)	2,131 (2 + 20 Tg.)	1,860 (22 Tagen)
Die n. d. sechsten Filtrierung benutzte Versuchstemperat.	ausging	ausging	20° (früher 0°)	ausging	ausging	0° (früh. 12°)	ausging	ausging	0° (früh. 20°)	ausging	ausging	0° (früh. 29°)
Siebentes Filtrat (nach Tagen)	—	—	1,769 (27 Tagen)	—	—	2,181 (27 Tagen)	—	—	1,990 (27 Tagen)	—	—	2,071 (27 Tagen)

waltenden Umständen entspricht. Ebenfalls zeigt die Figur, daß die Kurve Nr. 9, dem Versuch mit direkter Auskrystallisation entsprechend, sich zwar der Kurve Nr. 8 nähert, daß aber doch immer ein deutlicher Abstand zwischen diesen Kurven bleibt, was ja bedeutet, daß im Versuche Nr. 9 das Gleichgewicht selbst nach 6-tägiger Krystallisation nicht erreicht worden ist.



Krystallisationsdauer in Tagen.

Figur 25.

Die anderen drei Kurvensysteme der Figur 25 verstehen sich in ganz analoger Weise. Es geht sowohl aus diesen Kurven als auch aus dem Zahlenmaterial der Tabelle 43 hervor, daß die Krystallisationsgeschwindigkeit bei 0° weit geringer als bei den übrigen Versuchstemperaturen ist; besonders

deutlich tritt dieses Verhältnis bei dem Versuche Nr. 3 zutage, dessen Krystallisationskurve der Abszissenachse beinahe parallel verläuft. Was die drei anderen Versuchstemperaturen betrifft, so ist der Unterschied der Krystallisationsgeschwindigkeit weit weniger ausgeprägt, eine nähere Betrachtung von dem vorliegenden Zahlenmaterial zeigt aber doch, daß die Krystallisationsgeschwindigkeit im großen und ganzen desto größer, je höher die Temperatur ist. Die Differenz zwischen dem im vierten Filtrate gefundenen Wert des Eihydratgehalts in Nr. 3 (direkte Krystallisation) und dem entsprechenden Wert in Nr. 2 (Gleichgewichtszustand) gibt ja jedenfalls ein annäherungsweise richtiges Maß derjenigen Menge des Eihydrats, welche die Lösung bei der Versuchstemperatur 0° über die dem Gleichgewichtszustande entsprechende Menge hinaus enthält, und eine analoge Betrachtung kann selbstverständlich den übrigen Versuchstemperaturen gegenüber geltend gemacht werden. Nun ist diese Differenz mit steigender Temperatur abnehmend, indem sie:

	für die Versuchstemperatur 0°	gleich	1,813,
»	»	»	12° » 0,541,
»	»	»	20° » 0,459 und
»	»	»	29° » 0,421

ist, und es ist naheliegend, die Ursache hierzu in einer mit der Temperatur steigenden Krystallisationsgeschwindigkeit zu suchen. Diese Auffassung stimmt auch mit dem rein unmittelbaren Eindruck überein, den man bekommt, wenn man eine und dieselbe Versuchsflüssigkeit bei verschiedenen Temperaturen krystallisieren läßt.

Auch wenn von dem Gleichgewichtszustand der Systeme die Rede wird, scheidet sich die Versuchstemperatur 0° stark von den übrigen aus. Während nämlich das von uns untersuchte System, welches 24,044 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser enthält, im Gleichgewichtszustand auf 100 g Wasser bei 29° ca. 1,6 g Eihydrat, bei 20° ca. 1,4 g und bei 12° g ca. 1,5 g enthält, so enthält es bei 0° mehr als 2 g. Übrigens deuten die angeführten Zahlen darauf, daß zwischen 12° und 29° vielleicht in der Nähe von

20° eine Optimaltemperatur befindlich ist, bei welcher die Lösung im Gleichgewichtszustand und unter sonst gleichen Verhältnissen ein Minimum von Eihydrat enthält. Die gefundenen Verschiedenheiten sind zwar nur klein, wir machen aber darauf aufmerksam, weil wir bei Versuchen, welche andere Zwecke verfolgten, Verhältnisse gefunden haben, die in dieselbe Richtung zeigen.¹⁾ Ebenfalls erinnern wir in diesem Zusammenhang daran, daß die im vorhergehenden²⁾ beschriebenen Versuche zur Bestimmung des Faktors r keine Andeutung davon geben, daß bei höherer Temperatur ein anders zusammengesetztes Eihydrat krystallisiert als dasjenige, welches sich bei niedrigerer Temperatur ausscheidet, andererseits darf man aber nicht vergessen, daß die höchste Temperatur, welche bei der Faktorbestimmung angewandt wurde, nur 24° betrug.

Wie schon oben gesagt, wurde ein Teil der Versuchsflüssigkeiten, nachdem die Proben für die vierte Filtrierung herausgenommen waren, bei anderen Temperaturen angebracht als denjenigen, bei welchen diese Flüssigkeiten bisher gestanden hatten. Die Absicht damit war zu untersuchen, ob hier vielleicht ein gewöhnlicher, von der Temperatur abhängiger und deshalb mit der Temperatur verschiebbarer Gleichgewichtszustand vorlag, und die Versuchsergebnisse zeigten in sehr deutlicher Weise, daß dem wirklich so war. Die Versuchsanordnung nebst den Analysenresultaten sind in den 5 untersten, wagerechten Reihen der Tabelle 43 mitgeteilt.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Versuchsmischung Nr. 2, welche sich bei 0° in Gleichgewicht befand, und welche nach 9 Tagen zu 29° übergeführt wurde, nach der Überführung weiter krystallisierte, und dasselbe geschah mit der Versuchsmischung Nr. 3, welche nach 22-tägiger direkter Krystallisation von 0° zu 20° übergeführt wurde. Daß die entgegengesetzte Wirkung, eine Auflösung schon gebildeter Krystalle, durch Überführung von 20 oder 29° zu 0° hervorgerufen werden kann, das zeigen die Versuche Nr. 8 und 11

¹⁾ Vgl. H. Chick und C. J. Martin, Biochemical Journal, Bd 7, S. 389 (1913).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 224 u. 225 (1918).

(Gleichgewichtszustand) und übrigens auch die Versuche Nr. 9 und Nr. 12 (direkte Auskrystallisation). Endlich zeigt der Versuch Nr. 5, daß ein Überführen eines bei 12° im Gleichgewicht befindlichen Systems zu 29° eine wenn auch geringfügige Auflösung schon auskrystallisierten Eihydrats bewirken wird; dieses steht in gutem Einklang mit dem, was schon oben gesagt ist, daß die Eihydratkonzentration größer bei 29° als bei 12° ist, wenn das System bei der betreffenden Temperatur in Gleichgewicht ist. In qualitativer Beziehung verhalten sich demnach die hier untersuchten Gemische von Eieralbuminkrystallen und umgebender Mutterlauge vollständig wie Systeme, welche sich in einem von der Temperatur abhängigen Gleichgewichtszustand befinden. Wir verhehlen indessen nicht, daß die quantitative Übereinstimmung der Eihydratkonzentrationen der verschiedenen Versuche, welche auf verschiedenen Wegen unter die gleichen Bedingungen gebracht worden sind, etwas zu wünschen übrig läßt. Eine Durchsicht der untersten Reihen der Tabelle 43 wird zeigen, daß es sich hier um Abweichungen handelt, die etwas größer als unsere üblichen Versuchsfehler sind. Der Grund hierzu ist mutmaßlich derjenige, daß die Auflösung und ganz besonders die Auskrystallisation des Eihydrats so langsam von statten geht, vor allem bei niedrigen Temperaturen, daß es kaum möglich sein wird, innerhalb nicht allzulanger Zeiten einen vollständigen und absoluten Gleichgewichtszustand zu erreichen.

C. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eieralbumins und für den Gleichgewichtszustand zwischen dem auskrystallisierten Niederschlag und der umgebenden Mutterlauge.

Versuchsreihe f. Diese Reihe, welche im August 1914 bei Zimmertemperatur (ca. 20°) ausgeführt wurde, bestand aus 18 Versuchen. Die Eihydratkonzentration war vor der Krystallisation in sämtlichen Versuchen ungefähr die gleiche, während die Ammoniumsulfatkonzentration in den ersten 9 Versuchen etwas kleiner als in den letzten 9 Versuchen war, indem auf 100 g Wasser

25,947 g Ammoniumsulfat } in den Versuchsgemischen
 nebst 8,594 g Eihydrat } Nr. 1—9
 und

27,121 g Ammoniumsulfat } in den Versuchsgemischen
 nebst 8,642 g Eihydrat } Nr. 10—18.
 kamen.

Die Wasserstoffionenkonzentration variierte innerhalb jeder der zwei Versuchsgruppen von $p_{\text{H}} = \text{ca. } 3,9$ bis $p_{\text{H}} = \text{ca. } 5,3$.

Zur Darstellung dieser Versuchsgemische dienten eine Eieralbuminlösung und eine starke Ammoniumsulfatlösung, beide von bekannter Zusammensetzung, nebst drei aus letzterer hergestellten Lösungen, welche sämtlich die gleiche Menge Ammoniumsulfat enthielten, von welchen aber die eine («sauer» bezeichnet) mit verdünnter Schwefelsäure, die andere («alkalisch» bezeichnet) mit verdünntem Ammoniak und die dritte («neutral») mit Wasser versetzt worden war.

Wir machten uns jetzt vorerst zwei Stammlösungen, eine für jede der zwei Versuchsgruppen und solcherweise, daß die für die Versuche Nr. 1—9 bestimmte Lösung («schwach» gemarkt) aus

1000 ccm Eieralbuminlösung

430 » Wasser

und 570 » Ammoniumsulfatlösung

hergestellt wurde, während die Stammlösung für die Versuche Nr. 10—18 («stark» gemarkt) aus

1000 ccm Eieralbuminlösung

395 » Wasser

und 605 » Ammoniumsulfatlösung bestand.

Diese beiden Stammlösungen blieben bei der Vermischung und während der nachfolgenden Abmessung für die einzelnen Versuche vollständig klar, nach ein paar Stunden aber fing der von «stark» übriggebliebene Rest zu krystallisieren an, und dasselbe tat am nächsten Tag das Überbleibsel von «schwach».

Die einzelnen Versuchsgemische wurden durch Vermischen genau abgemessener Mengen der Stammlösungen mit kleinen, nach der verlangten Wasserstoffionenkonzentration gewählten

Mengen von «sauer», «neutral» oder «alkalisch» dargestellt, indem immer für jede 50 ccm Stammlösung 3 ccm von diesen drei Lösungen zusammen gebraucht wurden. Die Zusammensetzung der 9 ersten Versuchsflüssigkeiten war die folgende:

Versuchs-Nr.	Stammlösung «schwach»	«sauer»	«neutral»	«alkalisch»
1	150 ccm	9,0 ccm	0 ccm	0 ccm
2	150 »	7,5 »	1,5 »	0 »
3	250 »	10,0 »	5,0 »	0 »
4	250 »	7,5 »	7,5 »	0 »
5	250 »	5,5 »	9,5 »	0 »
6	250 »	3,5 »	11,5 »	0 »
7	250 »	1,5 »	13,5 »	0 »
8	250 »	0,0 »	15,0 »	0 »
9	150 »	0,0 »	7,5 »	1,5 »

Die Zusammensetzung der 9 anderen Versuchsflüssigkeiten war mit den obigen ganz analog, derart, daß Nr. 10 der Nr. 1, Nr. 11 der Nr. 2 usw. entsprach, nur wurde die Stammlösung «stark» benutzt.

Betreffs der Krystallisation dieser Flüssigkeiten ist zu bemerken: die abgemessene Stammlösung wurde zuerst mit der bestimmten Menge «neutral» versetzt, der dadurch entstandene Niederschlag ließ sich in sämtlichen Versuchen durch Schütteln wieder in Lösung bringen, und dasselbe war auch bei dem nachfolgenden Zusatz von «alkalisch» zu Nr. 9 und Nr. 18 und von «sauer» zu Nr. 5, Nr. 6, Nr. 7, Nr. 15 und Nr. 16 der Fall. In diesen sämtlichen Flüssigkeiten fing die Krystallisation nach $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde an und verlief normal. Dagegen entstand in Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4, Nr. 10, Nr. 11, Nr. 12, Nr. 13 und Nr. 14, also in sämtlichen der sauersten Mischungen, bei dem Zusatz von «sauer» ein so reichlicher, voluminöser Niederschlag, daß sich derselbe auch durch anhaltendes, sorgfältiges Schütteln nicht wieder in Lösung bringen ließ; bezüglich der sauersten Proben war der Niederschlag noch dazu von einer etwas klebrigen Konsistenz, was bewirkte, daß sich ein Teil des Niederschlags an den Boden und die Seiten des Kolbens haftete. Dieser klebrige Niederschlag, welcher in Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, Nr. 10 und Nr. 11 auftrat, ver-

änderte während des Stehenlassens der Flüssigkeit seinen Charakter nicht, wogegen der aufgeschwemmte Niederschlag nach und nach krystallinisch wurde, gleichwie sich auch in den sauersten Mischungen ein ausgeprägt krystallinischer Niederschlag während des Stehenlassens bildete. Betreffs des Aussehens des Niederschlags unter dem Mikroskop wird auf die Tabelle 44, zweiten, senkrechten Stab verwiesen (S. 303).

Die Probenahme mit nachfolgender Analyse des Filtrats wurde in der üblichen Weise nach beziehungsweise 2-, 5- und 21-tägigem Stehenlassen vorgenommen. Die Bestimmung des Ammoniakstickstoffs wurde nur in den Filtraten der zweiten Probenahme (nach 5 Tagen) ausgeführt und hat das folgende Resultat ergeben: ¹⁾

Die verschiedenen Filtrate enthielten von Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser:

Nr. 1 : (26,032) g	Nr. 10 : (27,481) g
• 2 : (26,013) »	• 11 : (26,978) »
• 3 : 25,958 »	• 12 : 27,130 »
• 4 : 25,960 »	• 13 : 27,130 »
• 5 : 25,933 »	• 14 : 27,147 »
• 6 : 25,933 »	• 15 : 27,120 »
• 7 : 25,929 »	• 16 : 27,096 »
• 8 : 25,966 »	• 17 : 27,102 »
• 9 : 25,954 »	• 18 : 27,125 »
<hr/> Mittel : 25,947 g	<hr/> Mittel : 27,121 g

Es geht aus der obigen Zusammenstellung hervor, daß die zwei sauersten Versuchsgemische jeder Gruppe einen von dem der übrigen Gemische der Gruppe etwas abweichenden Ammoniumsulfatgehalt zeigen; hierin liegt nichts Besonderes, denn eben diese Versuche gaben ja, wie schon genannt, eine reichliche Ausscheidung von einem harzartigen Niederschlag, welcher wahrscheinlich von einer Zusammensetzung ist, die von derjenigen des krystallinischen Eieralbumins abweicht.

¹⁾ Bei der Berechnung des Ammoniumsulfatgehalts der Nr. 9 und Nr. 18 ist es mitberücksichtigt worden, daß diese beiden Versuchsgemische mit «alkalisch» versetzt sind; die darin gegenwärtige überschüssige Ammoniakmenge ist in den angegebenen Ammoniumsulfatmengen nicht mit einbegriffen.

Sieht man von diesen Versuchen ab, so ist die Übereinstimmung der für den Ammoniumsulfatgehalt gefundenen Werte eine vorzügliche, und wir haben deshalb in der Tabelle 44 nur die Mittelwerte der Bestimmungen angeführt, gleichwie wir diese Mittelwerte bei der Berechnung vom Gehalt der Filtrate an Eihydrat benutzt haben.

Tabelle 44.
(Versuchsreihe f; August 1914.)

Nr. des Ver- suchs	Aussehen des Niederschlags unter dem Mikroskop	Eihydratgehalt des Filtrats in g auf 100 g Wasser.			Die Wasser- stoffionenkon- zentration des Filtrats (nach 5- u. n. 21 täg. Krystalli- sationsdauer)	
		bei der ersten Filtrie- rung (nach 2 Tagen)	bei der zweiten Filtrie- rung (nach 5 Tagen)	bei der dritten Filtrie- rung (nach 21 Tagen)	$h \cdot 10^6$	p_H

Die Versuchsgemische enthielten 25,947 g Ammoniumsulfat und 8,594 g Eihydrat auf 100 g Wasser

1	Nach 1-tägigem Stehenlassen klebte der Niederschlag als eine zähe, unter dem Mikroskop völlig amorphe Masse am Kolbenboden fest. Diese harzartige Masse veränderte ihren Charakter während des Stehenlassens nicht, es bildete sich aber außerdem ein in der Flüssigkeit leicht aufschleimbarer Niederschlag, welcher sich unter dem Mikroskop deutlich krystallinisch zeigte (Nr. 1 und 2: ganz kleine Krystalle; Nr. 3: die Krystalle ein wenig größer).	3,214	0,977	0,797	115,0	3,94
2		3,207	1,922	0,860	81,3	4,09
3		3,814	0,711	0,712	63,1	4,20
4	Ganz kleine, aber wohlentwickelte, nadelförmige Krystalle, welche nur selten zu Bündeln oder Haufen vereinigt waren.	0,550	0,512	0,492	42,7	4,37
5		0,445	0,416	0,389	31,6	4,50
6	Nadelförmige, in Bündeln oder Haufen vereinigte, ziemlich große Krystalle.	0,459	0,428	0,402	22,4	4,65
7		0,667	0,639	0,599	14,1	4,85
8	Schöne, große nadelförmige Krystalle.	1,096	1,032	0,982	9,55	5,02
9	Lange, wohlentwickelte prismatische Krystalle.	3,684	3,217	2,914	5,01	5,30

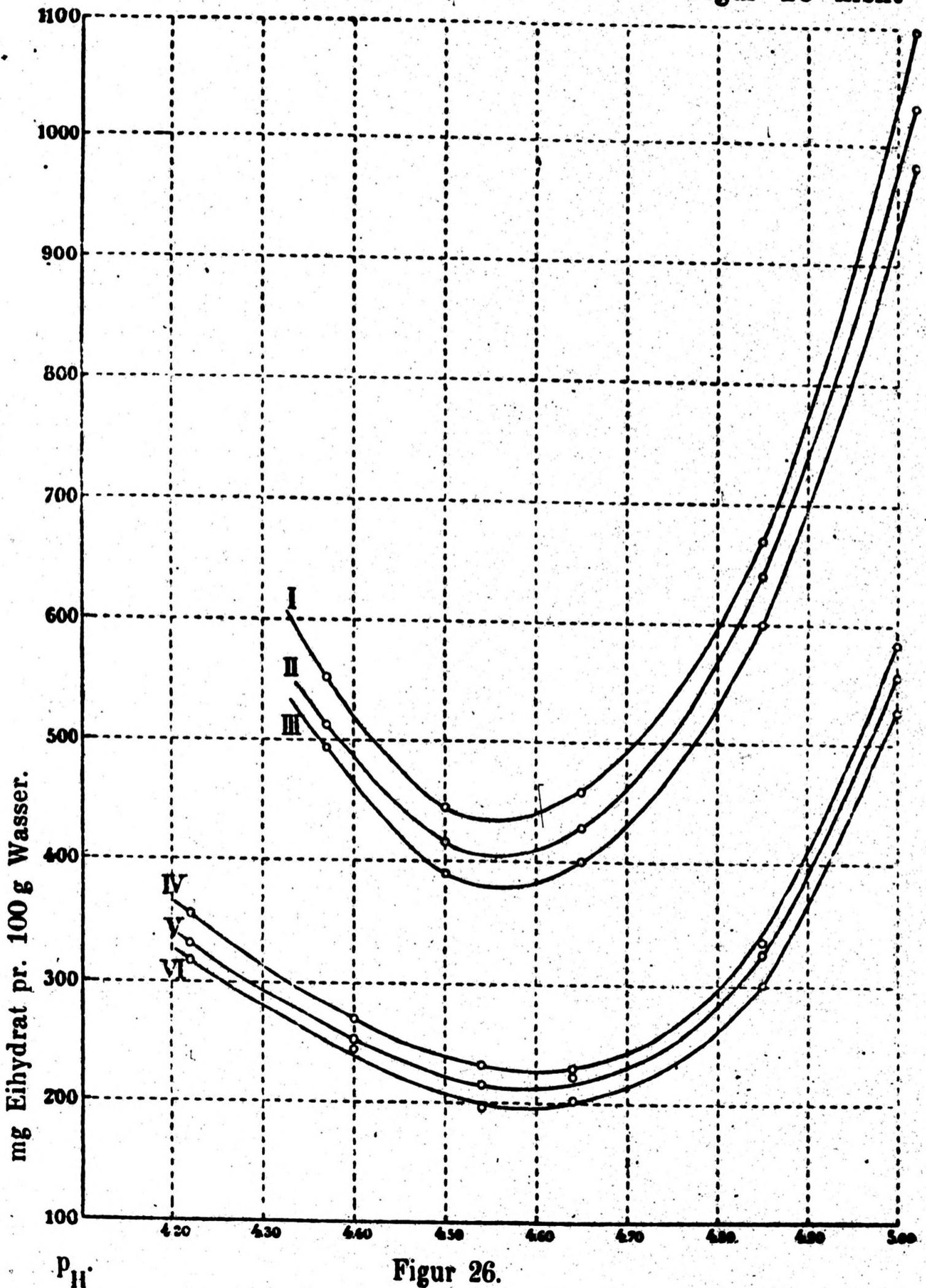
Tabelle 44 (Fortsetzung).

Nr. des Ver- suchs	Aussehen des Niederschlags unter dem Mikroskop	Eihydratgehalt des Filtrats in g auf 100 g Wasser			Die Wasser- stoffionenkon- zentration des Filtrats (nach 5- u. n. 21 täg. Krystalli- sationsdauer)	
		bei der ersten Filtrie- rung (nach 2 Tagen) g	bei der zweiten Filtrie- rung (nach 5 Tagen) g	bei der dritten Filtrie- rung (nach 21 Tagen) g	$h \cdot 10^6$	p_H
Die Versuchsgemische enthielten 27,121 g Ammoniumsulfat und 8,642 g Eihydrat auf 100 g Wasser						
10	Das Aussehen ganz wie das bei Nr. 1 und 2 beschriebene.	1,315	1,249	0,333	120,2	3,92
11		1,736	1,447	0,468	87,1	4,06
12	Der Niederschlag bestand aus mikrokrystallinen, nicht harzartigen Massen, welche nach und nach deutlich kry- stallinisch wurden.	0,354	0,330	0,317	60,3	4,22
13	Ganz wie Nr. 4 und 5.	0,269	0,252	0,245	39,8	4,40
14		0,232	0,215	0,197	28,8	4,54
15	Ganz wie Nr. 6 und 7.	0,229	0,222	0,202	22,9	4,64
16		0,335	0,326	0,301	14,1	4,85
17	Große nadelförmige Krystalle, die oft in Bündeln vereinigt waren.	0,584	0,555	0,528	10,0	5,00
18	Große nadelförmige Krystalle, mit langen wohl entwickelten Prismen gemischt.	1,812	1,693	1,595	6,03	5,22

Die Wasserstoffionenkonzentration der Filtrate wurde sowohl nach 5- als auch nach 21-tägiger Krystallisation gemessen. Die Übereinstimmung zwischen den beiden Messungsreihen war gewöhnlich gut, und wir haben deshalb in der Tabelle 44 nur die Mittelwerte der Messungen notiert.

In der Tabelle 44 sind die Versuchsergebnisse in der üblichen Weise zusammengestellt, und in der Figur 26, welche die wichtigsten dieser Ergebnisse graphisch wiedergibt, ist der Gehalt der Filtrate an Eihydrat in mg auf 100 g Wasser als Ordinate, und das p_H des Filtrats als Abszisse benutzt worden. Das obere Kurvenbündel der Figur 26 entspricht den Versuchen mit der schwächeren Ammoniumsulfatkonzentration

(Kurve I, II und III für respektive 2-, 5- und 21-tägige Krystallisationsdauer), während das untere Bündel die Versuche mit der stärkeren Ammoniumsulfatkonzentration (Kurve IV, V und VI für respektive 2-, 5- und 21-tägige Krystallisationsdauer) wiedergibt. Die Resultate der sauersten Versuchsgemische, welche, wie schon mehreremal gesagt, keine normale Krystallisation ergaben, sind auf der Figur 26 nicht



Figur 26.

aufgenommen, und dasselbe gilt von den beiden am wenigsten sauren Versuchsgemischen, welche — mit dem benutzten Maßstab — auf der Figur keinen Raum haben finden können.

Figur 26 gibt demnach nur das für die Eieralbuminkrystallisation zentrale Gebiet der Wasserstoffionenkonzentration wieder, und sowohl die Figur 26 als auch die Tabelle 44 zeigen deutlich, daß sich innerhalb dieses Gebiets eine der Krystallisation optimale Wasserstoffionenkonzentration findet, bei welcher die Krystallisation unter sonst gleichen Umständen am weitesten fortschreitet. Diese optimale Wasserstoffionenkonzentration, die dem $p_{\text{H}} = \text{ca. } 4,58$ entspricht, ist für die beiden hier erwähnten Versuchsgruppen sehr angenähert dieselbe, und die Lage des Optimalpunkts verschiebt sich während der fortschreitenden Krystallisation nicht nachweisbar.

Es ist nicht zu vergessen, daß die hier erwähnten Versuche Versuche der direkten Krystallisation sind, und daß man demgemäß den wirklichen Gleichgewichtszustand bei ihnen zu erreichen nicht erwarten kann, selbst auch dann nicht, wenn die Krystallisationsdauer sich auf 21 Tage erstreckt; man kann aber, unseren bisherigen Erfahrungen gemäß (siehe z. B. Abschnitt A), mit gutem Grund erwarten, daß diejenigen Kurven, welche den wirklichen Gleichgewichtszuständen entsprechen, ganz dasselbe Aussehen wie die Kurven der Figur 26 haben müssen, nur daß jene aber ein wenig niedriger liegen als diese. Der Optimalpunkt des wirklichen Gleichgewichts wird deshalb wahrscheinlich auch bei $p_{\text{H}} = \text{ca. } 4,58$ gelegen sein. Wir können bei dieser Gelegenheit noch bemerken, daß wir bei einigen einleitenden Versuchen über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eieralbumins, welche wir im Februar 1913 bei ca. 5° ausführten, fanden, daß das Eieralbumin auch bei dieser verhältnismäßig niedrigen Temperatur unter sonst gleichen Umständen am vollständigsten bei Wasserstoffionenkonzentrationen, welche dem $p_{\text{H}} = 4,5 - 4,6$ entsprechen, krystallisierte.

An den beiden Seiten des Optimalpunkts wird die Krystallisation natürlich weniger vollständig sein als bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration selbst, die Sache liegt aber etwas verschieden, je nachdem man nach der alkalischen oder nach der sauren Seite hin geht. Figur 26 zeigt deutlich, wie schroff die Kurven mit wachsendem p_H ansteigen, und aus den in der Tabelle 44 angeführten Werten des Eihydratgehalts der Filtrate von den Versuchen Nr. 8 und Nr. 9 beziehungsweise Nr. 17 und Nr. 18 erhellt es ferner, daß ein geringer Zuwachs des p_H einen außerordentlich großen Zuwachs des Eihydratgehalts zur Folge hat. Eine durch Zusatz von Ammoniak hervorgebrachte Verkleinerung der Wasserstoffionenkonzentration hat somit, was die hier behandelte Frage betrifft, keinen weiteren Einfluß als denjenigen, die Menge des auskrystallisierten Eieralbumins zu vermindern, das Aussehen und der Charakter dieses Niederschlags dagegen bleiben dieselben.

Ganz anders liegt die Sache, wenn man die Wasserstoffionenkonzentration durch Zugabe von Schwefelsäure über die optimale hinaus vergrößert. Ein kleiner Zuwachs der Wasserstoffionenkonzentration bewirkt nur einen verhältnismäßig kleinen Zuwachs des Eihydratgehalts der Mutterlauge, ein größerer Zuwachs der Wasserstoffionenkonzentration aber gibt nicht nur einen größeren Zuwachs des Eihydratgehalts der Mutterlauge, sondern außerdem eine durchgreifende Änderung des Aussehens und des Charakters des gebildeten Niederschlags: wahrscheinlich handelt es sich hier um die Ausscheidung eines Körpers, der schwefelsäurereicher ist als das gewöhnliche krystallisierte Eieralbumin. Eine genauere Durchsicht der Tabelle 44 zeigt außerdem, daß der Eihydratgehalt der Filtrate durchgehends höher ist im Versuch Nr. 2 als in Nr. 1 und in Nr. 11 als in Nr. 10. Ist dies mehr als ein bloßer Zufall, so deutet es darauf hin, daß die Ausfällung — von einer Auskrystallisation kann kaum mehr die Rede sein — bei noch größeren Wasser-

stoffionenkonzentrationen wieder zunimmt, was mit der wohl-bekannteren Erscheinung, daß die ausfällende Wirkung solcher Salze wie Ammoniumsulfat durch Säurezusatz vergrößert wird, in gutem Einklang steht. Aus der Tabelle 44 ersieht man weiter, daß der Zuwachs des Eihydratgehalts der Filtrate mit steigender Wasserstoffionenkonzentration bei der stärkeren Ammoniumsulfatkonzentration weniger ausgesprochen ist als bei der schwächeren, was jedenfalls bei der dritten Filtration deutlich hervortritt, wo man wohl annehmen darf, nicht weit vom Gleichgewicht entfernt zu sein. Es ist deshalb wohl möglich, daß man bei hinlänglich starken Ammoniumsulfatkonzentrationen mit steigender Wasserstoffionenkonzentration keinen Zuwachs des Eihydratgehalts des Filtrats nachweisen kann, dagegen aber eine gleichmäßige Abnahme, so wie es H. Chick und C. J. Martin¹⁾ beim Ausfällen — nicht Auskrystallisieren — von Eieralbumin bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration und in der Gegenwart reichlichen Ammoniumsulfats gefunden haben.

Zur Beleuchtung eines Verhältnisses, auf welches wir schon im Abschnitt A dieser Abhandlung (siehe S. 285) aufmerksam gemacht haben, möchten wir noch hinzufügen, daß die Rückstände der Versuchsflüssigkeiten der obenerwähnten Versuchsreihe noch ein paar Monate nach dem Abschluß derselben in den Kolben bei Zimmertemperatur stehen blieben. Während dieser Zeit trat, was eine Reihe der Proben betrifft, keine sichtbare Änderung ein, und die dann ausgeführten Analysen gaben einen ganz ähnlichen Eihydratgehalt der Filtrate als denjenigen, welcher nach der dritten Filtrierung gefunden wurde; dies galt besonders den wenigst sauren, ammoniumsulfatreichen Versuchsflüssigkeiten (den Versuchsnummern 14, 15, 16, 17 und 18). Betreffs anderer Mischungen und ganz besonders der Versuchsnummern 2, 3, 4, 8, 10, 11, 12 und 13 war dagegen eine bakterielle Umbildung des krystallisierbaren Eieralbumins in nicht krystallisierbare Körper eingetreten. Die Menge des ausgeschiedenen Niederschlags hatte in diesen Proben mehr oder weniger abgenommen, ja im Versuch Nr. 2 war der Niederschlag völlig in Lösung gegangen. Der Eihydratgehalt der Filtrate hatte natürlich in entsprechendem Grad zugenommen, indem die Umbildung nicht so weit vorgeschritten war, daß mehr als ganz kleine Mengen nicht koagulierbarer Verbindungen gebildet worden waren.

¹⁾ Biochemical Journal Bd. 7, S. 386 (1913).

D. Die Bedeutung der Proteinkonzentration für die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eieralbumins und für den Gleichgewichtszustand zwischen dem auskrystallisierten Niederschlag und der demselben umgebenden Mutterlauge.

Schon in der Einleitung dieser Abhandlung (S. 271) ist es erwähnt, daß es eine allgemeine Annahme ist, daß die Proteinstoffe, unter sonst gleichen Umständen, um so vollständiger ausgesalzen werden, je größer die anfängliche Proteinkonzentration ist, und die Arbeit von H. Chick und C. J. Martin¹⁾ über das Fällen des Eieralbumins mittels Ammoniumsulfats wurde als Beispiel derartiger Untersuchungen herangezogen. Es ist auch in der Einleitung angedeutet, wie die Versuchsergebnisse von Chick und Martin unserer Meinung nach zu erklären sind, und wir werden jetzt durch eine Besprechung der Einzelheiten der Versuche die Richtigkeit dieser Erklärung darzutun suchen.

Chick und Martin haben eine Reihe von Fällungen gereinigten Eieralbumins mittels Ammoniumsulfats gemacht, indem die Albuminkonzentration in den einzelnen Versuchen eine verschiedene war, während das Verhältnis zwischen Ammoniumsulfat und Wasser in sämtlichen Versuchen das gleiche und zwar 31 : 100 blieb. Die Tabelle 45 gibt das Zahlenmaterial von Chick und Martin diese Versuchsreihe betreffend wieder.

Da Chick und Martin den Albumingehalt der Filtrate durch Hitzekoagulation mit nachfolgendem Wägen des abfiltrierten, gewaschenen und getrockneten Koagulums bestimmen,²⁾ so darf man wohl annehmen, daß die in der Tabelle 45 aufgeführten Albuminmengen auch in dieser Weise bestimmt worden sind. Chick und Martin müssen dann voraussetzen, daß das durch Ammoniumsulfat ausgesalzene Eieralbumin die gleiche Zusammensetzung wie das durch Hitze koagulierte besitzt und somit wasserfrei sein muß, denn nur mit dieser Voraussetzung wird das Verhältnis Ammoniumsulfat : Wasser in allen Filtraten dasselbe und dem ursprünglichen Verhältnis

¹⁾ l. c. S. 380 (1913).

²⁾ l. c. S. 383 (1913).

31 : 100 gleich sein. Es ist aus der Beschreibung der Versuche nicht zu ersehen, ob der Ammoniakstickstoff in den Filtraten bestimmt worden ist oder nicht, und wir sind deshalb geneigt zu glauben, daß solche Bestimmungen nicht ausgeführt sind. Wir meinen nämlich, daß es höchst unwahrscheinlich ist, daß sich das Eieralbumin durch Fällen mit Ammoniumsulfat in wasserfreiem Zustand ausscheiden sollte. Es ist gewiß kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Fällen des Eieralbumins durch Ammoniumsulfat und der Krystallisation desselben mittels desselben Salzes, und es scheint uns deshalb nicht ungereimt anzunehmen, daß sich das Eieralbumin beim Fällen mit einem ähnlichen Wassergehalt wie beim Krystallisieren ausscheidet. Ist dies aber richtig, dann ist es unmittelbar einleuchtend, daß die Auslegung, welche Chick und Martin von ihren Versuchsergebnissen geben, nicht stichhaltig ist, denn in diesem Falle wird die Lösung durch das Fällen ärmer an Wasser, das heißt die Ammoniumsulfatkonzentration derselben wächst, und dies um so mehr, je mehr Eieralbumin gefällt wird, oder, anders gesagt, je größer die anfängliche Konzentration desselben ist.

Wir haben die Versuche von Chick und Martin unter der Voraussetzung umgerechnet, daß das beim Fällen ausgeschiedene Eieralbumin denselben Wassergehalt wie das krystallisierte und zwar 0,22 g auf 1 g wasserfreies Albumin¹⁾ besitzt. Wir haben keine Garantie, daß eben dieser Wassergehalt der wirklichen Sachlage entspricht, wir hegen aber keinen Zweifel darüber, daß diese Berechnungsweise der Wahrheit näher kommt als die von Chick und Martin angewandte. Das Resultat der Umrechnung findet man in der Tabelle 46.

Es geht aus der Tabelle 46 hervor, daß, die Richtigkeit der angewandten Berechnungsweise vorausgesetzt, die Filtrate in den Versuchen von Chick und Martin eine desto größere Ammoniumsulfatkonzentration und eine desto geringere Ei-hydratkonzentration haben werden, je größer die ausgefällte Menge Ei-hydrat ist.²⁾

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 231 (1918).

²⁾ Der Versuch Nr. 3 fällt außerhalb der Reihe; schon die Zahlen

Tabelle 45

Die Versuche von Chick und Martin.
(l. c., S. 385, Tabelle III.)

Verhältnis: Salz/Wasser konstant = $\frac{31}{100}$.
Variierende Proteinkonzentration.

Al- bumin g	Wasser g	Salz g	100 g Mischung enthielten Albumin g	Albumin auf 31 g Salz und 100 g Wasser g	100 g Filtrat enthielten Albumin g	Aus 100 g der ur- sprügl. Mischung ist Albu- min gefällt g	Gefäll- tes Pro- tein %
1,90	56,92	17,65	2,481	3,33	1,130	1,351	54,4
1,90	36,92	11,44	3,775	5,14	1,115	2,660	70,4
3,79	50,85	15,76	5,383	7,45	1,159	4,224	78,5
7,59	53,69	16,64	9,738	14,13	0,935	8,803	90,4
4,74	17,31	5,36	17,306	27,40	0,772	16,534	95,5

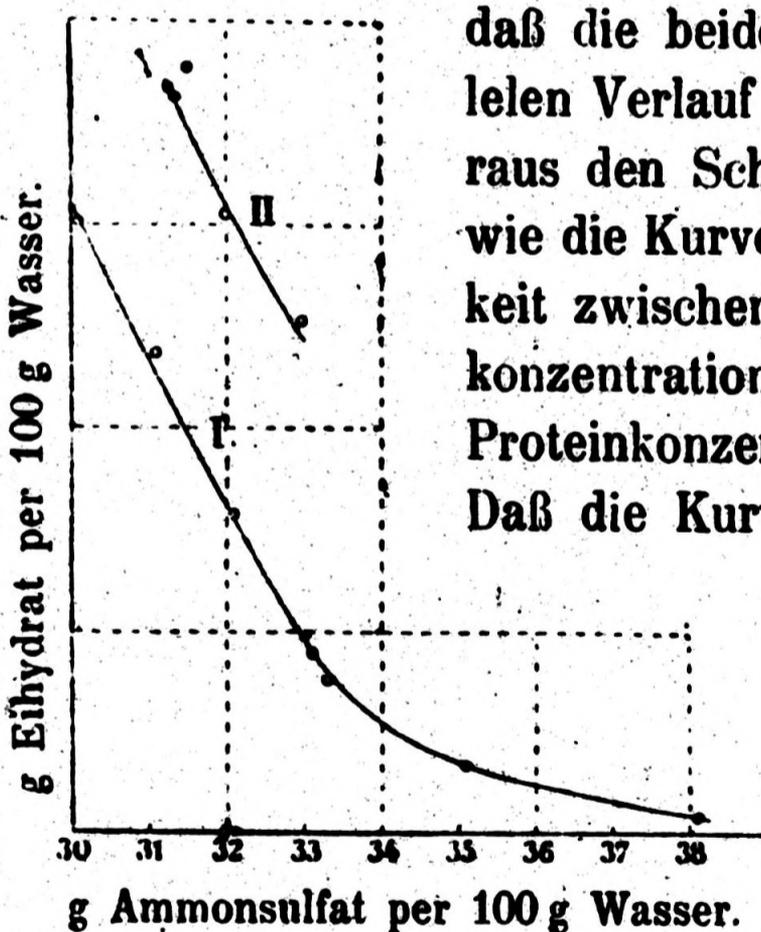
Tabelle 46.

Umrechnung der Versuche von Chick und Martin.

Eihydrat: Albumin + Wasser g	Wasser g	Salz g	Das ursprüng- liche Gemisch enthält demnach auf 100 g Wasser		g Eihydrat in 100 g Filtrat	g (Wasser + Salz) in 100 g Filtrat	Das Filtrat enthält dem- nach auf 100 g Wasser	
			Ei- hydrat g	Salz g			Ei- hydrat g	Salz g
1,90 + 0,42 = 2,32	56,92 ÷ 0,42 = 56,50	17,65	4,11	31,24	1,130 × 1,22 = 1,379	98,621	1,835	31,24
1,90 + 0,42 = 2,32	36,92 ÷ 0,42 = 36,50	11,44	6,36	31,34	1,115 × 1,22 = 1,360	98,640	1,811	31,34
3,79 + 0,83 = 4,62	50,85 ÷ 0,83 = 50,02	15,76	9,24	31,51	1,159 × 1,22 = 1,414	98,586	1,886	31,51
7,59 + 1,67 = 9,26	53,69 ÷ 1,67 = 52,02	16,64	17,80	31,99	0,935 × 1,22 = 1,141	98,859	1,523	31,99
4,74 + 1,04 = 5,78	17,31 ÷ 1,04 = 16,27	5,36	35,53	32,94	0,772 × 1,22 = 0,942	99,058	1,264	32,94

Chick und Martins (Tabelle 45, sechster senkrechter Stab) zeigen aber, daß hier ein Versuchsfehler vorliegt.

Drückt man die Abhängigkeit der Eihydratkonzentration der Filtrate von der Salzkonzentration derselben graphisch aus, so bekommt man die Kurve II der Figur 27, welche ohne Rücksichtnahme auf Versuch 3 (siehe die Bemerkung unterm Text) gezeichnet ist. Auf der Figur 27 findet man außer dieser Kurve noch eine andere Kurve, I gemarkt, welche die Abhängigkeit zwischen den Salz- und Eihydratkonzentrationen der Filtrate einer anderen von Chick und Martin ausgeführten Versuchsreihe wiedergibt,¹⁾ welche Reihe eben angestellt wurde, um die hier genannte Abhängigkeit zu untersuchen. Diese Versuchsreihe haben wir in ganz derselben Weise wie die obenerwähnte umgerechnet, die Umrechnung spielt aber hier eine weit geringere Rolle, weil alle Versuche mit der gleichen Albuminkonzentration anfangen, und dieselbe noch dazu eine ganz kleine, und zwar 1,3 g wasserfreies Albumin auf 100 g Wasser, war. Man ersieht aus der Figur 27,



Figur 27.

daß die beiden Kurven einen völlig parallelen Verlauf nehmen, und wir ziehen daraus den Schluß, daß die Kurve II gleichwie die Kurve I ein Ausdruck der Abhängigkeit zwischen der Salz- und der Eihydratkonzentration ist, mit der anfänglichen Proteinkonzentration aber nichts zu tun hat. Daß die Kurven I und II nicht zusammen-

fallen, muß davon herrühren, daß die betreffenden Versuche nicht unter den gleichen äußeren Bedingungen, z. B. nicht bei derselben Wasserstoffionenkonzentration ausgeführt sind, und daß ein

solcher Unterschied unter den beiden Reihen wirklich existiert, das geht aus dem Zahlenmaterial von Chick und Martin deutlich hervor. Während einerseits in der der Kurve I entsprechenden Reihe dasjenige Versuchsgemisch, welches auf 100 g Wasser 31 g Salz und 1,3 g Eihydrat enthält, ein Filtrat gibt, welches 0,733 g

¹⁾ l. c. S. 383, Tabelle II.

Albumin in 100 g enthält, so ersieht man andererseits aus der Tabelle 45, daß in der dieser entsprechenden Versuchsreihe, wo alle Versuchsgemische 31 g Salz auf 100 g Wasser enthalten, sämtliche Versuche Filtrate gegeben haben, welche mehr als 0,733 g Albumin in 100 g enthalten, und bei einer so geringen anfänglichen Proteinkonzentration als 1,3 g Albumin auf 100 g Wasser, muß der Gehalt an Albumin in 100 g Filtrat größer als 1,130 g sein (Tabelle 45, erster Versuch).

Wir meinen demnach, daß die Resultate, welche Chick und Martin in der hier ausführlich erwähnten Versuchsreihe erhalten haben, keinen Aufschluß über einen etwaigen Einfluß geben, den die anfängliche Proteinkonzentration auf die Zusammensetzung des Filtrats ausübt, sondern sich leicht und ungezwungen als eine Wirkung der verschiedenen Salzkonzentration der Filtrate erklären läßt. Die nächste Frage wird dann die folgende sein: In welcher Weise wird die Proteinkonzentration des Filtrats von der anfänglichen Proteinkonzentration abhängen, wenn man die Versuchsanordnung dermaßen einrichtet, daß die Ammoniumsulfatkonzentration der Filtrate in allen Versuchen wirklich die gleiche ist?

Schon in der Einleitung dieser Abhandlung haben wir hervorgehoben, daß die Gibbs'sche Phasenregel verlangt, daß die anfängliche Proteinkonzentration keinen Einfluß auf die Proteinkonzentration des Filtrats ausübt, und daß dem wirklich auch so ist, das haben wir mittels der beiden, im folgenden beschriebenen Versuchsreihen zu beweisen gesucht.

Versuchsreihe g. Diese Reihe, welche im Februar 1915 bei Zimmertemperatur (18°) ausgeführt wurde, bestand aus 5 Versuchen; während die Versuchsgemische alle annäherungsweise die gleiche Ammoniumsulfatkonzentration besaßen (durchschnittlich 26,658 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser), variierte die anfängliche Proteinkonzentration der 5 Versuche ungefähr wie 6 : 4 : 3 : 2 : 1, indem der Eihydratgehalt auf 100 g Wasser beziehungsweise 14,140 g (Nr. 1), 9,419 g (Nr. 2), 7,058 g (Nr. 3), 4,703 g (Nr. 4) und 2,350 g (Nr. 5) war.

Zur Darstellung dieser Versuchsgemische benutzten wir eine Eialbuminlösung, eine «starke» und eine «schwache» Ammoniumsulfatlösung, sämtliche von bekannter Zusammensetzung. Es wurde jetzt zu

Nr. 1	:	180	ccm	Eialbuminlösung
» 2	:	120	»	»
» 3	:	90	»	»
» 4	:	60	»	»
» 5	:	30	»	»

abgemessen.

Die abgemessenen Quantitäten Eialbuminlösung wurden gewogen, und wir berechneten, mit wieviel Wasser und wieviel der «schwachen» Ammoniumsulfatlösung die letzteren vier Nummern zu versetzen waren, damit jede derselben die gleiche Menge Wasser und Ammoniumsulfat wie Nr. 1 enthielte, und der einzige Unterschied im Gehalt an Eihydrat läge. Nachdem die solcherweise berechneten Mengen zugefügt waren, wurde jede der Lösungen mit 100 ccm «starke» Ammoniumsulfatlösung gefällt und endlich mit 5 Tropfen Impfungsmaterial geimpft.

Nachdem die «starke» Ammoniumsulfatlösung zugesetzt war, konnten sämtliche Lösungen durch Schütteln von amorphem Niederschlag befreit werden; immerhin war aber Nr. 1 stark und Nr. 2 etwas opaleszierend, die übrigen klar.

Nr. 1 krystallisierte in $\frac{1}{4}$ Stunde deutlich, und nach $1\frac{1}{2}$ Stunden bildete das Ganze eine breiige Masse.

Nr. 2 und 3 krystallisierten im Laufe von $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Stunde, und nach 3 Stunden bildeten auch diese beiden Lösungen beinahe breiartige Massen.

Nr. 4 krystallisierte langsamer, und erst nach 6 Stunden war ein reichlicher Niederschlag gebildet, während

Nr. 5 erst nach ein paar Stunden zu krystallisieren anfang; am nächsten Tag enthielt aber auch diese Mischung einen nicht unbedeutenden Niederschlag.

Die Probenahmen mit nachfolgender Analyse der Filtrate geschahen in der üblichen Weise nach 1-, 2-, 4-, 8- und 16-tägigem Stehenlassen. Der Gehalt an Ammoniakstickstoff wurde

nur in den Filtraten der 8-tägigen Krystallisation bestimmt, was die folgenden Ergebnisse lieferte:

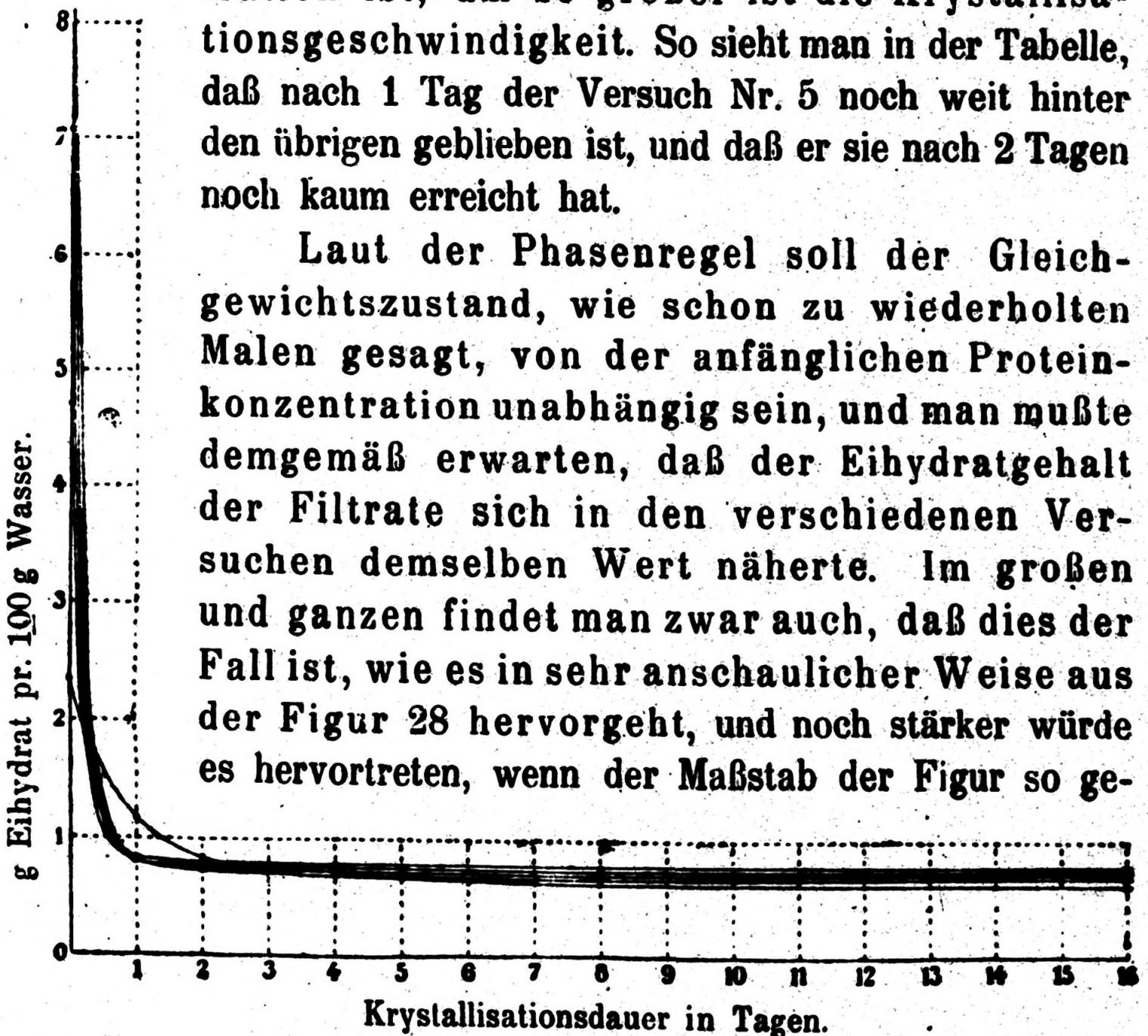
Nr. 1	: 26,716 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	pr. 100 g	Wasser
» 2	: 26,658	»	»	»
» 3	: 26,647	»	»	»
» 4	: 26,627	»	»	»
» 5	: 26,644	»	»	»

Mittel : 26,658 g (NH₄)₂ SO₄ pr. 100 g Wasser.

Die Konzentration der Wasserstoffionen wurde ebenfalls nur in den Filtraten der 8-tägigen Krystallisation gemessen. Die Analysenresultate sind in der Tabelle 47 zusammengestellt und durch Fig. 28 graphisch wiedergegeben.

Es erhellt aus der Tabelle 47 sowie auch aus den obigen Bemerkungen die Krystallisation der verschiedenen Proben betreffend, daß, je größer die anfängliche Proteinkonzentration ist, um so größer ist die Krystallisationsgeschwindigkeit. So sieht man in der Tabelle, daß nach 1 Tag der Versuch Nr. 5 noch weit hinter den übrigen geblieben ist, und daß er sie nach 2 Tagen noch kaum erreicht hat.

Laut der Phasenregel soll der Gleichgewichtszustand, wie schon zu wiederholten Malen gesagt, von der anfänglichen Proteinkonzentration unabhängig sein, und man mußte demgemäß erwarten, daß der Eihydratgehalt der Filtrate sich in den verschiedenen Versuchen demselben Wert näherte. Im großen und ganzen findet man zwar auch, daß dies der Fall ist, wie es in sehr anschaulicher Weise aus der Figur 28 hervorgeht, und noch stärker würde es hervortreten, wenn der Maßstab der Figur so ge-



Figur 28.

Tabelle 47.

(Versuchsreihe g; Februar 1915.)

Die Versuchsgemische enthielten 26,658 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser.

Nr. des Ver- suchs	Eihydratgehalt in g auf 100 g Wasser in den Versuchs- flüssigkeiten beim Anfang des Versuches und in den ver- schiedenen Filtraten						Die Wasserstoff- ionenkonzentra- tion des Filtrats (vierte Filtrie- rung)	
	Beim Anfang des Versuchs	Nach der ersten Filtrie- rung (1 Tag)	Nach der zweiten Filtrie- rung (2 Tagen)	Nach der dritten Filtrie- rung (4 Tagen)	Nach der vierten Filtrie- rung (8 Tagen)	Nach der fünften Filtrie- rung (16 Tagen)	h · 10 ⁶	P _H
	g	g	g	g	g	g		
1	14,140	0,841	0,806	0,777	0,768	0,768	13,49	4,870
2	9,419	0,806	0,779	0,750	0,726	0,735	13,18	4,880
3	7,058	0,804	0,745	0,714	0,692	0,718	13,06	4,884
4	4,703	0,806	0,724	0,677	0,654	0,670	13,06	4,884
5	2,350	1,172	0,826	0,677	0,613	0,597	12,97	4,887

wählt würde, daß auch die Anfangspunkte der den Versuchen Nr. 1 und 2 entsprechenden Kurven auf der Figur Platz finden könnten. Eine eingehendere Betrachtung der Figur 28 sowie auch eine Durchsicht der Tabelle 47 und besonders des sechsten und siebenten senkrechten Stabes derselben zeigen indessen eine zwar nicht große, jedoch aber deutliche Abnahme des Eihydratgehalts des Filtrats von dem Versuch Nr. 1 bis zu Versuch Nr. 5, also mit abnehmender anfänglicher Proteinkonzentration, und die Frage wird dann, wo die Ursache dieser Erscheinung zu suchen ist.

Man sieht, daß die Abweichungen der hier beschriebenen Versuche in eine Richtung gehen, welche derjenigen entgegengesetzt ist, die man nach der oben (S. 271) erwähnten gewöhnlichen Auffassung zu erwarten hatte, indem laut dieser Auffassung der Eihydratgehalt des Filtrats desto kleiner sein sollte, je größer die anfängliche Proteinkonzentration war; diese Auffassung findet demnach in den Ergebnissen unserer Versuche keine Stütze. Mit ähnlicher Sicherheit darf man annehmen, daß die Ursache des verschiedenen Eihydratgehalts der Filtrate

nicht in einer verschiedenen Konzentration des Ammoniumsulfats liegt, denn diese ist, wie oben gesagt, in sämtlichen Filtraten sehr nahe dieselbe, und ist übrigens am größten in Nr. 1 gefunden, wo auch der Eihydratgehalt am größten ist. Die Ursache der beobachteten Abnahme des Eihydratgehalts der Filtrate ist unserer Meinung nach wahrscheinlich in einem Verhältnis zu suchen, welches wir schon zu wiederholten Malen¹⁾ erwähnt haben, und zwar dasjenige, daß krystallisierbares Eieralbumin eine Neigung hat, sich durch Stehenlassen in nicht krystallisierbares, wohl aber völlig koagulierbares Albumin zu verwandeln. Daß eine bakterielle Einwirkung eine solche Umbildung hervorzurufen vermag, haben wir mehrere Male Gelegenheit zu beobachten gehabt, und es ist möglich, daß eine ähnliche, wenn auch quantitativ betrachtet geringfügigere Umbildung durch einfaches Stehenlassen wässriger Lösungen des Eieralbumins eintreten kann. Es ist deshalb in hohem Maß wahrscheinlich, daß eine wässrige Lösung von durch Umkrystallisieren völlig gereinigtem Eieralbumin nach einigem Stehenlassen immer kleine Mengen nicht krystallisierbares Eieralbumin enthalten wird, und diejenigen Eihydratmengen, die man nach einer Krystallisation im Filtrat findet, werden deshalb teils aus dem nicht auskrystallisierten Teil des krystallisierbaren Eieralbumins, teils aus dem gesamten nicht krystallisierbaren Albumin bestehen, und von diesem letzteren wird natürlich um so mehr vorhanden sein, je größer die anfängliche Proteinkonzentration gewesen ist. Nimmt man z. B. an, daß bei der Herstellung der Versuchsflüssigkeiten in der Versuchsreihe g 1% der ganzen Albuminmenge in nicht krystallisierbarer Modifikation vorhanden war, so gibt eine einfache Rechnung, daß der Inhalt von krystallisierbarem Eieralbumin in sämtlichen Filtraten nach 4- oder 8-tägigem Krystallisieren (dritte und vierte Filtrierung) sehr nahe derselbe ist.

	Dritte Filtrierung	Vierte Filtrierung
Nr. 1 :	0,777 — 0,141 = 0,636	0,768 — 0,141 = 0,627
2 :	0,750 — 0,094 = 0,656	0,726 — 0,094 = 0,632

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 103, S. 44 u. 285 (1918).

Dritte Filtrierung	Vierte Filtrierung
Nr. 3 : 0,714 — 0,071 = 0,643	0,692 — 0,071 = 0,621
4 : 0,677 — 0,047 = 0,630	0,654 — 0,047 = 0,607
5 : 0,677 — 0,024 = 0,653	0,613 — 0,024 = 0,589

Daß wir dritte und vierte Filtrierung und nicht die fünfte wählen, ist dadurch begründet, daß die Filtrate in mehreren der Versuche bei der fünften Filtrierung mehr Eihydrat als bei der vierten enthalten; dieses ist, wie schon oben bemerkt, (S. 308 und S. 315), ein Zeichen einer anfangenden bakteriellen Wirksamkeit, und wird demzufolge eine Stütze der von der hier behandelten Frage gegebenen Erklärung.

Schließlich kann man danach fragen, wie die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit denjenigen der früheren Reihen im Einklang stehen. Ein Vergleich läßt sich, was einen einzelnen Versuch betrifft, anstellen, wenn man sämtliche Faktoren, die den Verlauf der Krystallisation beeinflussen, mit in Betracht zieht. Aus Figur 24, Kurve I und II, die die Resultate der Versuchsreihe a (Tabelle 39) darstellen, erhellt es, daß, wenn die Krystallisation bei Zimmertemperatur stattfindet, und die anfängliche Proteinkonzentration ca. 10.5 g Eihydrat auf 100 g Wasser ausmacht, dann wird das Filtrat, wenn die Ammoniumsulfatkonzentration 26,658 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser beträgt,

nach 4-tägigem Stehenlassen 0,712 g Eihydrat auf 100 g Wasser (Kurve I) und

nach 13-tägigem Stehenlassen 0,678 g Eihydrat auf 100 g Wasser (Kurve II) enthalten.

In der Versuchsreihe g, Versuch Nr. 2, ist die Krystallisation unter annäherungsweise denselben Umständen wie in der Reihe a vorgegangen, nur die Wasserstoffionenkonzentration ist nicht genau dieselbe, indem sie in der Versuchsreihe a dem $p_{H^+} = 4,85-4,86$, im Versuch Nr. 2, der Versuchsreihe g, aber dem $p_{H^+} = 4,88$ entspricht. Aus der Figur 26 (S. 305) ersieht man jetzt, daß ein Filtrat mit $p_{H^+} = 4,88$ einen 1,07 mal so großen Eihydratgehalt wie ein Filtrat mit $p_{H^+} = 4,85-4,86$ besitzt.

Hierauf fußend kann man demnach berechnen, daß das Filtrat des Versuchs Nr. 2, Reihe g,

nach 4-tägigem Stehenlassen

$0,712 \cdot 1,07 = 0,762$ g Eihydrat auf 100 g Wasser und

nach 13-tägigem Stehenlassen

$0,678 \cdot 1,07 = 0,725$ g Eihydrat auf 100 g Wasser enthalten soll.

Aus der Tabelle 47 ersieht man, daß der beim Versuch Nr. 2 wirklich gefundene und der auf Grundlage früherer Versuchsreihen berechnete Eihydratgehalt des Filtrats in einem sogar sehr schönen Einklang stehen.

Während wir in der eben beschriebenen Versuchsreihe gleichwie in der Reihe a die direkte Krystallisation angewendet haben, so haben wir in der folgenden Reihe angestrebt, die Frage, was die anfängliche Proteinkonzentration für den Gleichgewichtszustand bedeutet, durch einige Versuche zu beleuchten, bei welchen das in der Versuchsreihe b benutzte Verfahren — reichliche Auskrystallisation mit nachfolgendem Lösen von etwas des krystallisierten Niederschlags — zur Anwendung kam.

Versuchsreihe h. Diese Reihe, die im April 1915 bei Zimmertemperatur (19°) ausgeführt wurde, bestand aus 4 Versuchen, von welcher Nr. 2 und 3 identisch waren. Zur Herstellung der Versuchsflüssigkeiten gebrauchten wir wie üblich eine Eialbuminlösung, eine «starke» und eine «schwache» Ammoniumsulfatlösung, sämtliche von bekannter Zusammensetzung. Es wurden zu dem

Versuch Nr. 1: 120 ccm Eialbuminlösung

» » 2: } 60

» » 3: }

und zum » » 4: 30

abgemessen und gewogen.

Sodann wurden Nr. 2, 3 und 4 mit denjenigen Mengen Wasser und «schwachen» Ammoniumsulfatlösung versetzt, welche notwendig waren, um jeder dieser Lösungen den gleichen Gehalt an Wasser und Salz wie Nr. 1 zu erteilen, wonach alle vier Lösungen durch Zusatz von 100 ccm «starker» Ammoniumsulfatlösung zu jeder Probe gefällt wurden. Jede der Lösungen enthielt demnach 27,277 g Ammoniumsulfat auf 100 g

Wasser, während der Eihydratgehalt auf 100 g Wasser in folgender Weise variierte:

Nr. 1:	10,433 g
» 2:	5,209 »
» 3:	5,215 »
und » 4:	2,608 »

Der beim Zusatz der «starken» Ammoniumsulfatlösung ausgeschiedene, amorphe Niederschlag ließ sich in sämtlichen Proben durch Schütteln wieder in Lösung bringen, Probe Nr. 1 blieb aber stark opaleszierend. In dieser letzteren trat reichliche Krystallisation schon nach $\frac{1}{4}$ Stunde ein, während dieses bei den Versuchen Nr. 2 und 3 erst nach 1 Stunde und bei Nr. 4 erst am nächsten Tag eintrat.

Nach insgesamt 2-tägiger Krystallisation wurde jedes Versuchsgemisch vorsichtig und unter gutem Schütteln mit 60 ccm «schwacher» Ammoniumsulfatlösung versetzt, wodurch der Ammoniumsulfatgehalt jeder Flüssigkeit 25,115 g auf 100 g Wasser wurde, während der Eihydratgehalt auf 100 g Wasser folgenderweise variierte:

Nr. 1 :	8,396 g
» 2 :	4,192 »
» 3 :	4,198 »
» 4 :	2,099 »

Die Probenahme mit nachfolgender Analyse geschah in der üblichen Weise 3 Stunden, 1, 3 und 8 Tage nach dem Zusatz der «schwachen» Ammoniumsulfatlösung. Der Ammoniakstickstoff wurde nur in den Filtraten des 3-tägigen Stehenlassens ermittelt, was die folgenden Resultate ergab:

Nr. 1 :	25,146 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	pr. 100 g	Wasser
» 2 :	25,123 »	»	»	»
» 3 :	25,079 »	»	»	»
» 4 :	25,113 »	»	»	»

Mittel : 25,115 g (NH₄)₂SO₄ pr. 100 g Wasser.

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde ebenfalls nur in diesen Filtraten festgestellt; die Ergebnisse der Analysen sind in der Tabelle 48 zusammengestellt.

Tabelle 48.

(Versuchsreihe h; April 1915).

Die Versuchsflüssigkeiten enthielten 25,115 g Ammoniumsulfat auf 100 g Wasser.

Nr. des Ver- suchs	Eihydratgehalt in g auf 100 g Wasser in den Versuchsflüssigkeiten nach Zusatz der «schwachen» Ammoniumsulfatlösung und in den verschiedenen Filtraten					Wasserstoffionenkonzentration des Filtrats, dritte Filtrierung	
	in der Ver- suchs- flüssigkeit	beim ersten Filtrieren (nach 3 Stunden)	beim zweiten Filtrieren (nach 1 Tag)	beim dritten Filtrieren (nach 3 Tagen)	beim vierten Filtrieren (nach 8 Tagen)	h · 10 ⁶	p _H
	g	g	g	g	g		
1	8,396	1,019	0,987	0,981	0,977	16,44	4,784
2	4,192	0,883	0,882	0,874	0,868	16,75	4,776
3	4,198	0,885	0,879	0,872	0,864	16,14	4,792
4	2,099	0,725	0,760	0,753	0,755	16,33	4,787

Aus der Tabelle 48 geht erstens hervor, daß die Parallelversuche Nr. 2 und Nr. 3 dieselben Resultate geben. Die Übereinstimmung ist sogar noch besser, als man nach der Größe der Versuchsfehler zu erwarten berechtigt war. Übrigens zeigt die Tabelle ein ganz ähnliches Bild wie die Tabelle 47, und die der letztgenannten angeknüpften Bemerkungen finden deshalb auch auf der Tabelle 48 Anwendung. Der Eihydratgehalt der Filtrate ist auch hier, wo von Gleichgewichtszuständen, oder wenigstens doch von Zuständen, die sich denselben stark nähern, die Rede ist, um so größer, je größer die anfängliche Proteinkonzentration gewesen ist. Der Unterschied des Eihydratgehalts der Filtrate ist in dieser Reihe etwas größer als in der vorigen, läßt sich aber natürlich in ganz ähnlicher Weise erklären.

Wir meinen dann berechtigt zu sein, aus den in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchen den folgenden Schluß zu ziehen, daß während die Krystallisationsgeschwindigkeit, wie schon oben gesagt, mit der anfänglichen Proteinkonzentration wächst, so ist der Gleichgewichtszustand von derselben unabhängig, indem die Abweichungen von dieser Regel, welche die Versuche gegeben haben, erstens nur von unter ge-

ordneter Bedeutung sind und zweitens sich leicht und ungezwungen erklären lassen.

Übersicht.

1. Wir haben durch eine Reihe Untersuchungen über das Auskrystallisieren des Eieralbumins mittels Ammoniumsulfats klarzulegen gesucht, welchen Einfluß die Krystallisationsbedingungen sowohl auf die Krystallisationsgeschwindigkeit als auch auf den Gleichgewichtszustand zwischen dem auskrystallisierten Eieralbumin und der dasselbe umgebenden Mutterlauge ausüben.

2. Die Krystallisationsgeschwindigkeit ist um so größer, je größer die Ammoniumsulfatkonzentration (Abschnitt A) und die anfängliche Proteinkonzentration (Abschnitt D) und je höher die Temperatur der Krystallisation (Abschnitt B) ist.

3. Im Gleichgewichtszustand wird — unter sonst gleichen Umständen — der Eihydratgehalt der Mutterlauge um so kleiner sein, je größer die Konzentration des Ammoniumsulfats ist (Abschnitt A).

Die dem Gleichgewichtszustand des Systems optimale Temperatur, das ist diejenige Temperatur, bei welcher der Eihydratgehalt der Mutterlauge, alles übrige gleich, am kleinsten ist, liegt zwischen 12° und 29° , wahrscheinlich in der Nähe von 20° . Es ist jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gleichgewichtszuständen des Systems innerhalb der Temperaturgrenzen 12° und 29° , während derjenige bei 0° ein ausgeprägt verschiedener ist, indem die Eihydratkonzentration der Mutterlauge bei 0° um ein bedeutendes größer ist als bei den höheren Temperaturen. Daß hier von wirklichen Gleichgewichtszuständen die Rede ist, zeigt sich dadurch, daß sich dieselben durch bloße Temperaturänderungen hin und her verschieben lassen (Abschnitt B).

Die dem Gleichgewichtszustand des Systems optimale Konzentration der Wasserstoffionen, das ist diejenige Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher — unter sonst gleichen Umständen — die Eihydratkonzentration der Mutter-

lauge am schwächsten ist, entspricht dem $p_H =$ etwa 4,58 und scheint von der Ammoniumsulfatkonzentration und der Krystallisationstemperatur unabhängig zu sein. Eine Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration übt keinen weiteren Einfluß aus als denjenigen, den Eihydratgehalt der Mutterlauge zu vergrößern, indem der Charakter und das Aussehen des ausgeschiedenen Niederschlags dadurch nicht verändert wird. Eine Vergrößerung der Wasserstoffionenkonzentration über die optimalen hinaus bewirkt dagegen nicht nur einen Zuwachs des Eihydratgehalts der Mutterlauge, sondern kann außerdem, wenn es sich um einen nur einigermaßen wesentlichen Zuwachs der Wasserstoffionenkonzentration handelt, eine durchgreifende Änderung sowohl des Charakters als auch des Aussehens des gebildeten Niederschlags hervorrufen (Abschnitt C).

Die anfängliche Proteinkonzentration ist auf das Gleichgewicht des Systems ohne Einfluß, die Abweichungen von dieser Regel, die die Versuche gegeben haben, sind nur von untergeordneter Bedeutung und leicht und ungezwungen zu erklären (Abschnitt D).

Das untersuchte System verhält sich im großen und ganzen wie ein heterogenes, der Gibbs'schen Phasenregel gehorchendes System, das aus den vier Komponenten: Wasser, Eihydrat, Ammoniak und Schwefelsäure besteht.

Mai 1917.
