

Methode dadurch, daß gefärbte Flüssigkeiten ausscheiden mit Ausnahme von solchen, die im Violett absorbieren. Bei Substanzen, welche durch violettes und ultraviolettes Licht zersetzt werden, ist es notwendig, den aktiven Teil des Hg-Lichts herauszufiltern. Auf den Vorteil der Methode als analytisches Hilfsmittel möchten wir noch nicht näher eingehen, bevor sie nicht durch weitere Beispiele noch größere Sicherheit erlangt hat.

---

221. F. F. Nord, Olga-Maria v. Ranke-Abonyi und Gertrud Weiß: Bedeutung der Kryolyse für enzymatische Vorgänge und die Emulsions-Bildung\*).

[Aus d. Tierärztl. Hochschule Berlin<sup>1)</sup>.]

(Eingegangen am 12. Mai 1932.)

### 1. Einleitung.

Gelegentlich der letzten Berliner Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft konnten wir, im Rahmen unserer Untersuchungen über den Mechanismus der Enzymwirkung, über die Kinetik der durch lebende Hefezellen bewirkten Zymase-Gärung berichten<sup>2)</sup>. Im Gegensatz zur Slator-schen Auffassung ging aus den mitgeteilten Kurven hervor, daß der eigentliche Gärverlauf durch eine zusammengesetzte exponentielle Gleichung wiederzugeben ist und demgemäß keiner einfachen monomolekularen Reaktion entspricht. Ihren Ursprung hatten diese Untersuchungen — wie auch damals erwähnt — in der Beobachtung, daß sich unter Einhaltung bestimmter physikalischer Bedingungen Lösungen herstellen lassen, in denen die im lyophil-kolloiden Zustand befindlichen Enzyme eine monatelange Wirksamkeit zeigten.

Entsprechend unserer früher geäußerten Hypothese<sup>3)</sup> wurde dann bei der Weiterführung der Arbeiten festgestellt, daß an der Oberfläche der Teilchen der Enzym-Lösungen dieselben Gase adsorbiert bzw. in kolloidchemisch sich verwandt verhaltenden Eialbumin-, Gummi-arabicum-, Natrium-oleat- und sonstigen Lösungen verzehrt werden können, die bei verschiedenen Zellreaktionen eine Erhöhung der enzymatischen Tätigkeit durch Steigerung der Zellpermeabilität bewirken. Die der Frostwirkung ausgesetzten Zymase-Lösungen zeigten außer der verlängerten Haltbarkeit insofern eine auffallende Eigenschaft, als sie neben einer vorübergehend beträchtlich gesteigerten Gärfähigkeit einen Anstieg der Oberflächenspannung und ein Sinken der Viscosität aufwiesen. Die Veränderung beider Faktoren erreichte nach wenigen Tagen ein bestimmtes Maximum bzw. Minimum. Die bei der Vergärung von Glykose erzeugte Kohlensäure-Menge stieg dermaßen, daß sie kurz nach Beendigung der

\* ) Vortrag für die 37. Hauptversammlung d. Deutschen Bunsen-Gesellschaft in Münster i. W., Pfingsten 1932.

<sup>1)</sup> Dem Centrallaboratorium der Bayer. Stickstoffwerke sei auch an dieser Stelle dafür gedankt, daß es uns zur Durchführung einiger Messungen die entgegenkommende Erlaubnis, die dortigen Instrumente zu benutzen, bzw. die Arbeitsmöglichkeit gegeben hat.

<sup>2)</sup> Ztschr. Elektrochem. 35, 612 [1929]; Ergebn. Enzym-Forsch. 1, 77 [1932].

<sup>3)</sup> F. F. Nord, Nature 120, 82 [1927].

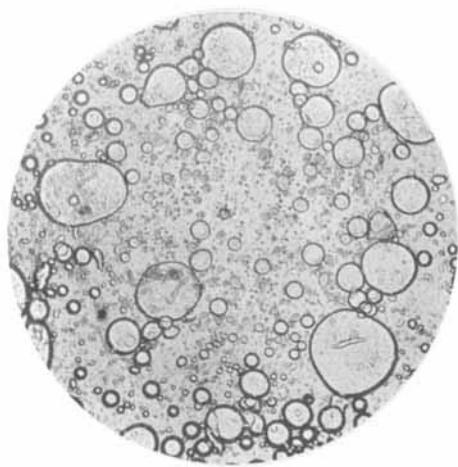


Fig. 1.

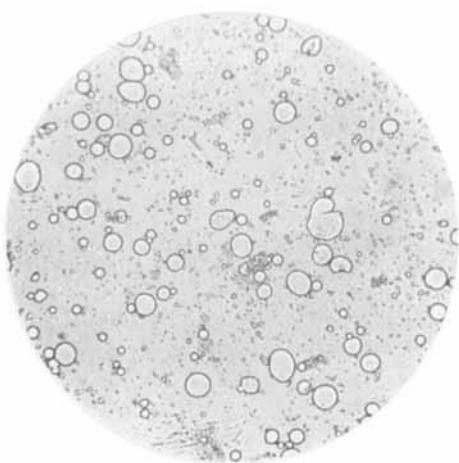


Fig. 2.

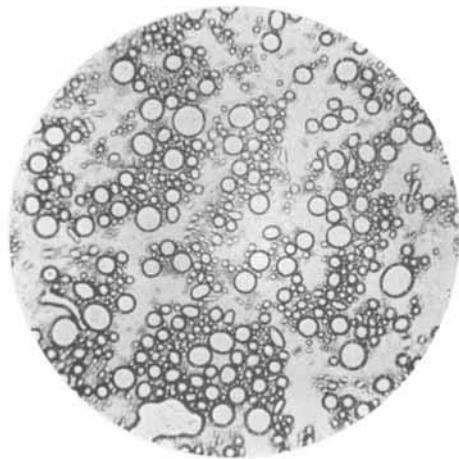


Fig. 3.

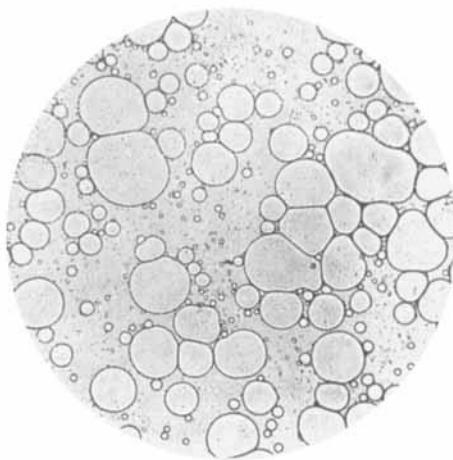


Fig. 4.

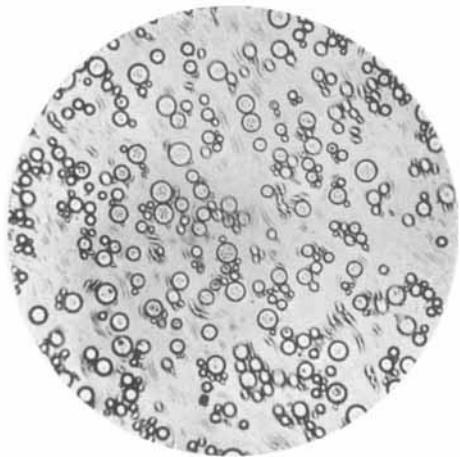


Fig. 5.

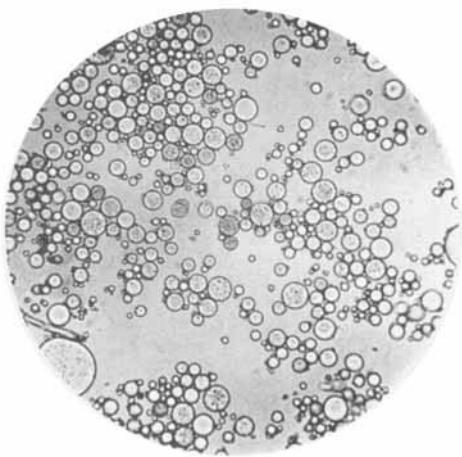


Fig. 6.

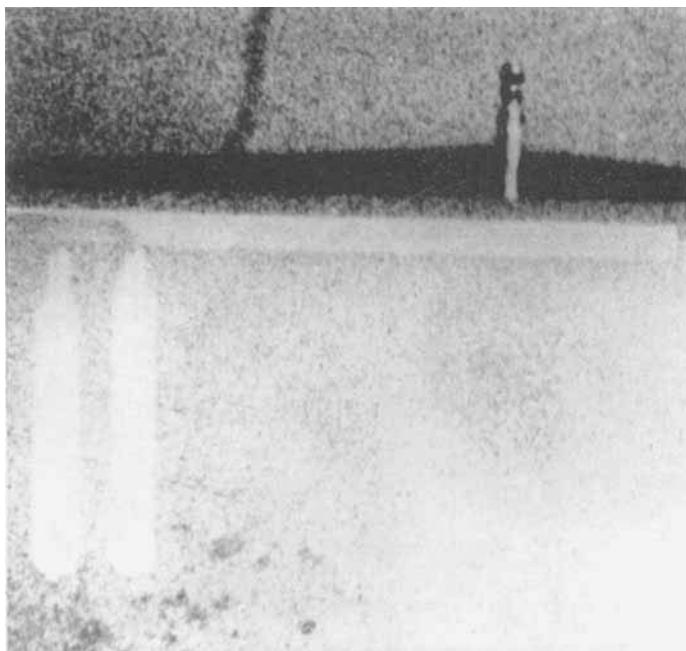


Fig. 7.

Reagensgläser, enthaltend die gleiche Menge je einer 0.1-proz. bei  $-180^{\circ}$  gefrorenen Eialbumin- (rechts) bzw. Natriumoleat-Lösung (links) in gefrorenem Zustand.

„Induktionszeit“ bis 6.6 ccm/Min. betrug, um nachher bald auf das übliche Maß zurückzusinken. Die graduelle Steigerung hörte am 4. bis 5. Tage auf, um dann im Laufe der Hauptgärperiode praktisch gleichmäßig zu bleiben.

Tabelle I.

Oberflächenspannung, Viscosität und entsprechende Gärgeschwindigkeit von gefrorenen Zymase-Lösungen.

Nach Tagen Frostwirkung	Oberflächenspannung in Dyn/cm bei 25°	Relative Viscosität in Sekunden bei 25°	Entsprechende CO <sub>2</sub> -Menge in 1 Min.
0	41.45	80.80	4.4 <sup>4)</sup> )
1	43.67	79.1	4.8 <sup>5)</sup> )
3	45.89	78.4	2.3 <sup>6)</sup> )
5	42.93 <sup>4)</sup> )	76.4	2.4 <sup>6)</sup> )
15	42.93 <sup>4)</sup> )	76.2	2.1 <sup>6)</sup> )
28	44.41	76.7	2.2 <sup>6)</sup> )
57	44.41	76.4	1.2 <sup>8)</sup> )

Es war von Interesse, in diesen Versuchen festzustellen, daß die Spitzenleistung in der Gärfähigkeit dieser Zymase-Lösungen nach den ersten Minuten, unabhängig von der kaum veränderten Zucker-Konzentration, auf das übliche Maß zurückfiel. Daraus ergab sich der Schluß, daß die im Vergleich mit den sonst gewonnenen Lösungen vielleicht höher oberflächen-wirksamen Zymasen gegen Proteolyse und Produkte des Hefen-Stoffwechsels empfindlicher sind. Wenn also in einer biochemischen Reaktion das ideale Verhältnis zwischen wirksamer und unwirksamer Enzymmenge mit 1 angenommen wird, so wird im Laufe der Reaktion das Verhältnis zwischen wirksamen und „geschädigten“ Enzymen mehr und mehr unter 1 sinken. Dieser Satz stützt sich natürlich auf die Annahme, daß die Leistungen der Enzyme von ihrer Oberflächen-Wirksamkeit abhängig sind. Unmittelbar nach dem Reaktions-Beginn erleidet diese Oberfläche Veränderungen, infolge welcher die Geschwindigkeit der Reaktion sinkt, unabhängig von etwaigen Änderungen der Substrat-Konzentration. Durch die Adsorbierbarkeit der für die früheren Versuche herangezogenen Gase konnte (a) die Verschiebung des erwähnten Koeffizienten verzögert werden und (b) bei gleichzeitiger Instabilität des Adsorptionsfilms die Möglichkeit der „Schutzwirkung“ dieser Verbindungen experimentell erhärtet werden.

Um die früher<sup>7)</sup> gegebene Deutung zu vertiefen, stellten wir uns nunmehr zur Aufgabe, die einleitend erwähnte Beobachtung der Frostwirkung an kolloidchemisch verwandten, aber verhältnismäßig definierten Lösungen bzw. Emulsionen einer ins einzelne gehenden Untersuchung zu unterwerfen, zumal, trotz der unleugbaren Wichtigkeit der Kryolyse, insbesondere lyophiler Kolloide für die Deutung von Vorgängen im Protoplasma bzw. in der tierischen und pflanzlichen Zelle überhaupt, dieser Gegenstand in den letzten Jahrzehnten eine kaum nennenswerte Bearbeitung vom physi-

<sup>4)</sup> Das plötzliche Sinken ist die Folge einer vorübergehenden Temperatur-Erniedrigung im elektrischen Kühlschrank; ein Teil der Enzym-Träger fiel dadurch aus und blieb auch nach dem Auftauen in Suspension.

<sup>5)</sup> Bei 1 g Glykose.

<sup>6)</sup> Bei 0.5 g Glykose.

<sup>7)</sup> Protoplasma 4, 547 [1928].

kalisch-chemischen Standpunkt aus gefunden hat<sup>8)</sup>). Ähnlich wie in unseren <sup>8a)</sup> früheren Untersuchungen handelt es sich also auch hier um einen Beitrag zur Deutung des physikalisch-chemischen Mechanismus einer Reaktion.

Bevor wir in die Beschreibung der Versuche bzw. Erörterung der Ergebnisse eintreten, müssen wir in Erinnerung zurückrufen, daß die Oberflächenspannungen der gefrorenen Zymase-Lösung erheblich anstiegen, die relativen Viscositäten sanken und die Kohlensäure-Erzeugung wiederum höher wurde. Voraussetzung für das Verständnis der ersten und dritten Gruppe der Erscheinungen dürfte unseres Erachtens, abgesehen von den Folgen einer denkbaren Dehydratisierung der Kolloidteilchen, die Möglichkeit sein, daß der Radius der lyophil-kolloiden Teilchen sich nach Einwirkung des Frostes verkleinert und dementsprechend ihre Oberfläche sich vergrößert hatte. Aber auch die Tatsache, daß die relativen Viscositäten in eindeutiger Weise durchgehend gesunken sind, müßte mit der erhöhten Oberflächenspannung bzw. der gesteigerten Fähigkeit zur Kohlensäure-Erzeugung nicht in Widerspruch stehen, wenn wir (a) uns daran erinnern, daß die Zymase-Lösung im Vergleich z. B. mit einer Eialbumin-Lösung keine homogene, sondern eine mehr an heterogene Systeme erinnnernde Zusammensetzung besitzt, (b) daran denken, daß Variierungen der Viscosität lyophiler Sole nach Kruyt<sup>9)</sup> vielfach nicht der Änderung der Hydratation, sondern der geänderten elektrischen Ladung zuzuschreiben sind, und (c) nicht übersehen, daß es Sole gibt<sup>10)</sup>, deren Viscosität mit der Zeit, wenn auch sehr wenig, aber regelmäßig abnimmt.

Wenn auch die Annahme von der durchgehenden Disaggregation der lyophil-kolloiden Teilchen unter der Einwirkung des Frostes auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheint, aber nicht unwahrscheinlich ist, so erhob sich weiter die Frage nach einer Einheitlichkeit der Folgen der Frostwirkung auf den Dispersitätsgrad der Teilchen. Würden nämlich diese in den lyophil-kolloiden Lösungen unter dem Einfluß des Frostes lediglich eine Disaggregation erleiden, dann müßten sich sowohl Oberflächenspannung als auch Viscosität der Lösungen erhöhen. Sollte aber infolge der Frostwirkung sowohl eine Disaggregation als auch eine Aggregation<sup>11)</sup> der Teilchen eintreten, dann können Überdeckungen zustande kommen. Dies jedoch würde zur Folge haben, daß Oberflächenspannungen und Viscositäten verschieden gerichtete Veränderungen erleiden können, bzw. es kann ein Teil der kolloiden Teilchen nach dem Auftauen aggregiert oder suspendiert bleiben, wodurch wohl die Erhöhung der Oberflächenspannung nicht verhindert wird, aber trotz vergrößerter Oberfläche ein Sinken der Viscosität eintreten kann.

<sup>8)</sup> H. Molisch, Untersuchungen über das Erfrieren von Pflanzen, Jena 1897; P. Bachmetjew, Experimentelle entomologische Studien vom physikalisch-chemischen Standpunkte aus, Bd. 1, Leipzig 1901; A. Lottermoser, Ztschr. physikal. Chem. **60**, 462 [1907]; E. Fuld u. J. Wohlgemuth, Biochem. Ztschr. **5**, 118 [1907]; H. W. Fischer, Cohns Beitr. zur Biol. d. Pflanzen **10**, 133 [1911].

<sup>8a)</sup> vergl. z. B. F. F. Nord, B. **52**, 1705 [1919].

<sup>9)</sup> H. R. Kruyt, Kolloid-Ztschr. **31**, 338 [1922].

<sup>10)</sup> H. R. Kruyt u. H. C. Winkler, Kolloidchem. Beihefte **32**, 375 [1931].

<sup>11)</sup> vergl. die aggregierende Wirkung des Frostes z. B. auf den Erdboden: E. Jung, Dissertat. Breslau 1931.

Als Substrate unserer Messungen dienten: 1. Eialbumin-Lösungen, 2. Gelatine-Lösungen<sup>12)</sup>, 3. Gummi-arabicum-Lösungen, 4. Lösungen von Saponin aus Radix Saponaria (Merck) mit 2.9% Aschengehalt, 5. Natriumoleat-Lösungen und 6. die mit Hilfe der vorgenannten Kolloide hergestellten Emulsionen von Olivenöl in Wasser. Bestimmend für diese Auswahl war, (a) daß nach den neuesten Ergebnissen der Enzym-Forschung die im krystallinen Zustand erhaltenen Enzyme, wie z. B. Pepsin<sup>13)</sup> oder Urease<sup>13)</sup>, eiweiß-artige Substanzen sein dürften. Eialbumin kann in Übereinstimmung mit den Untersuchungs-Ergebnissen von Sörensen<sup>14)</sup> bzw. Svedberg und Sjögren<sup>15)</sup> als eine chemische Einheit mit dem Bence-Jones-Protein ähnlichen Eigenschaften betrachtet werden. (b) Im Gegensatz hierzu stellt Gelatine entsprechend den Befunden britischer Autoren<sup>16-18)</sup> einen sowohl chemisch als auch physikalisch heterogenen Körper (Mol.-Gew. 10000-40000)<sup>19)</sup> dar. (c und d) So-wohl Gummi arabicum als auch die Saponine gehören in die Gruppe der Glucoside mit der Maßgabe, daß im Falle des Gummi arabicum die Hexosen bzw. Pentosen im allgemeinen an komplexe Säuren gebunden sind, wogegen die in den Saponinen befindlichen, an die Zucker gebundenen Reste Umwandlungsprodukte der Sterine darstellen. Bei den letzteren haben wir in der Zusammensetzung eine einfache Erklärung einerseits für ihre erhebliche Wasser-Löslichkeit, andererseits für die starke Capillaraktivität. (e) Im Gegensatz zu den Saponinen gehört Natriumoleat zu der Gruppe der kolloiden Elektrolyte.

## 2. Methoden und Apparate.

### A. Die Kryolyse.

Die in verschiedenen Konzentrationen angewandten Lösungen der lyophilen Kolloide wurden im allgemeinen der Frostwirkung bei -10° bis -18°, -79° und -180° bei verschiedener Friedauer ausgesetzt. Die Temperaturen wurden durch Verwendung einer Eis-Kochsalz-Mischung, fester Kohlensäure<sup>20)</sup> bzw. flüssiger Luft hergestellt. Es wurden Versuche zum raschen, zum langsamem und zum wiederholten Frieren einer Lösung angestellt. Die Messungen wurden immer an den eben aufgetauten Lösungen ausgeführt, wobei zu beachten ist, daß das Auftauen grundsätzlich bei Zimmer-Temperatur erfolgte. Bei den Emulsionen bestand keinerlei Beziehung zwischen dem Zeitpunkt der Herstellung der Emulsion und dem Zeitpunkt der Ausführung der Messung. Bei der Kryolyse der Lösungen, mittels derer die Emulsionen hergestellt wurden, kam die Temperatur bei -180° auf Grund der später noch zu besprechenden Erfahrungen, die bei der Messung der Lösungen selbst gewonnen worden waren, nicht zur Anwendung. Es ist also grundsätzlich zu beachten, daß wir nicht fertige Emulsionen der Kryolyse unterworfen haben.

<sup>12)</sup> Die Gelatine stammte von den Deutschen Gelatine-Werken in Göppingen und wurde uns von der I.-G. Farbenindustrie A.-G. (Agfa) in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

<sup>13)</sup> vergl. J. H. Northrop bzw. J. B. Sumner, Ergebn. d. Enzym-Forsch. 1, 295, 302 [1932].

<sup>14)</sup> S. P. L. Sörensen, Mitteil. Carlsberg Laboratorium 12, 1915-1917.

<sup>15)</sup> T. Svedberg u. Sjögren, Journ. Amer. chem. Soc. 51, 3594 [1929].

<sup>16)</sup> W. B. Hardy, Proceed. Roy. Soc. London 56, 95 [1900].

<sup>17)</sup> D. J. Lloyd, Biochem. Journ. 14, 147 [1920].

<sup>18)</sup> E. W. J. Mardles, Transact. Faraday Soc. 26, 753 [1930].

<sup>19)</sup> vergl. auch N. Marinesco, Compt. rend. Acad. Sciences 192, 625 [1931].

<sup>20)</sup> Für die Bereitstellung der festen Kohlensäure sind wir dem Ammoniak-Werk Merseburg, Leunawerke, zu Dank verpflichtet.

## B. Meßmethoden.

1. Die Bestimmung der Oberflächenspannungen der Lösungen wurde bei Zimmer-Temperatur mit dem Tensiometer von Du Noüy, wie von Nord und Franke<sup>21)</sup> angegeben, ausgeführt. Die Messungen der Oberflächenspannungen an Emulsionen und an den 1- bzw. 2-proz. Lösungen, mittels derer die Emulsionen hergestellt waren, wurden mit einem geraden Stalagmometer nach Traube ausgeführt; das Stalagmometer wurde mit einer aufgesetzten Capillare versehen, so daß 5 ccm destilliertes Wasser bei einer Temperatur von 22° in 48 Tropfen ausflossen.

2. Die Viscositäten der Lösungen wurden im Wasser-Thermostaten bei 22° im Ostwald-Viscosimeter bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen als „relative Viscositäten“, bezogen auf Wasser gleicher Temperatur, angegeben. Die Viscosität der Emulsionen und der hierher gehörigen 1- bzw. 2-proz. Lösungen wurden im Wasser-Thermostaten bei 18° im Vogel-Ossag-Viscosimeter gemessen. Diese Ergebnisse sind in den Tabellen als „absolute Fließzeiten“ in Sekunden angegeben.

3. Bestimmung der Leitfähigkeit: Die elektrische Leitfähigkeit wurde nach der Methode von Kohlrausch mit Wechselstrom und Telephon gemessen. Die Widerstands-Kapazität des Widerstands-Gefäßes betrug im Falle der Lösungen C = 0.2900 bei 22°, im Falle der Emulsionen und der dazu gehörigen Lösungen 0.312 bei 18°. Die Messungen wurden mit je 20 ccm der ungefrorenen bzw. gefrorenen Lösungen und Emulsionen ausgeführt. Zur Kontrolle wurde jede Messung mit zwei Vergleichs-Widerständen verschiedener Stärke je 2—3-mal nachgeprüft. Trotz der geringen Leitfähigkeit der Eialbumin- bzw. Gummi-arabicum-Lösungen wurden die Widerstände so gewählt, daß die Messungen möglichst in der Mitte der Wheatstoneschen Brücke ausgeführt werden konnten. Grundbedingung für die Erzielung reproduzierbarer Werte bei der Messung der Leitfähigkeit der in unseren Versuchen angewandten und unter den beschriebenen Bedingungen hergestellten Emulsionen war, daß die Emulsionen bis zum Augenblick der Ablesung des gemessenen Widerstandes gleichmäßig und ohne Unterbrechung geführt wurden. Unterblieb das Röhren oder wurde es frühzeitig abgebrochen, so konnte, im richtigen Gegensatz zu den Erfahrungen von Fricke und Morse<sup>22)</sup>, ein Steigen der Leitfähigkeit wahrgenommen werden. Dieses ist ohne weiteres verständlich, wenn wir uns klar machen, daß mit dem Einstellen des Röhrens das Aufrahmen der Emulsionen einsetzt und hiermit eine Anreicherung des leitenden Emulgators in der Umgebung der Meß-Elektrode beginnt.

4. Bestimmung der kataphoretischen Wanderungs-Geschwindigkeit: Größere Schwierigkeiten bot die Bestimmung der kataphoretischen Wanderungs-Geschwindigkeit kolloider Teilchen im elektrischen Felde. Es wäre wünschenswert gewesen, hierzu die sorgfältig durchgearbeitete Methode des Svedbergschen Laboratoriums<sup>23)</sup> anzuwenden. Von dieser Absicht mußten wir aber mangels einer geeigneten Vorrichtung zum Photographieren der wandernden Grenzschichten absehen. Eine für die Ergebnisse gleichwertige, in der Ausführung jedoch etwas einfachere Methode haben Bendien und Janssen<sup>24)</sup> angegeben. Die Apparatur bestand aus einer modifizierten Burton'schen Zelle mit einer Elektroden-Entfernung von etwa 40 mm, die zum guten Temperatur-Ausgleich in einem mit Wasser gefüllten Thermostaten benutzt wurde. Die Messungen wurden bei 19° ausgeführt. Mit Hilfe einer Lupe war es möglich, die Lage der Grenzflächen bis auf 0.1 mm zu schätzen. Es gelang uns, die Grenzflächen bereits mit einer kleinen Bogenlampe, die über dem Apparat befestigt war, und die ihr Licht direkt auf die Grenzflächen warf, sichtbar zu machen. Es genügten für jede Bestimmung 7 ccm der kolloiden Lösung. Auf diese Weise war es möglich, die Wanderungs-Geschwindigkeiten

<sup>21)</sup> l. c., Fußnote 7, S. 1149.

<sup>22)</sup> H. Fricke u. S. Morse, Physical Review **25**, 365 [1925].

<sup>23)</sup> vergl. A. Tiselius, Nova Acta R. Soc. Sci. Upsaliensis [4] **7**, Nr. 4 [1930].

<sup>24)</sup> S. G. T. Bendien u. L. W. Janssen, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **46**, 739 [1927], 47, 1042 [1928].

gefrorener und ungefrorener Eialbumin- bzw. Gelatine-Lösungen zu bestimmen<sup>25)</sup>. Dagegen gelang es uns nicht, die Grenzfläche bei einer Gummi-arabicum-Lösung sichtbar zu machen. Bei jeder Lösung mußten erst die der jeweiligen Konzentration der kolloiden Lösung am besten entsprechenden Einflußzeiten in Blindversuchen bestimmt werden, um eine sich deutlich abhebende Grenzfläche zu erhalten. Die Meßdauer betrug im Durchschnitt 120 Min.; abgelesen wurde alle 15—20 Min., und die Versuchs-Dauer so lange ausgedehnt, bis die Grenzflächen undeutlich wurden. Diese Erscheinung trat bei allen gefrorenen Lösungen (außer der einprozentigen Eialbumin-Lösung) regelmäßig 15—20 Min. früher ein, als bei den ungefrorenen, so daß hierdurch jede Messung aus 6—7 Ablesungen bestand.

Sämtliche Lösungen wurden mit Leitfähigkeits-Wasser hergestellt. Die Leitfähigkeit des Wassers wurde selbstverständlich von den gefundenen Werten in Abzug gebracht; die des Olivenöls war unterhalb der Meßgrenze unserer Apparatur und wurde deshalb vernachlässigt. Die ungefrorenen Eialbumin-Lösungen wurden unter Toluol aufbewahrt. Das verwendete Gummi arabicum war ein Kahlbaum-Präparat D. A. B. 6. Mit Rücksicht auf dessen Empfindlichkeit für Elektrolyte<sup>26)</sup> haben wir von einer Entfernung der Asche abgesehen. Die von uns verwendeten Sole waren glasklar. Es zeigte sich in ihnen auch nach monatelanger Aufbewahrung bei Zimmer-Temperatur weder irgend eine Fällung noch bakterielle Einwirkung. Die Konzentration der Lösungen bewegte sich im Bereich von  $1 \cdot 10^{-6}$  %. Die Konzentration der Eialbumin-Lösungen wurde durch Zurückwägen des vorher durch Abzentrifugieren abgetrennten ungelösten Trockenrückstandes der Einwaage bestimmt. Sämtliche Emulsionen wurden mit Olivenöl hergestellt, das einen Gehalt von 0.4% freier Säure, berechnet als Ölsäure, enthielt. Zur Emulgierung wurden 2%, bei Natriumoleat 1% der Emulgatoren in wäßriger Lösung verwendet. Die Emulsionen enthielten jeweils 10% Olivenöl, berechnet auf die fertig gestellte Emulsion. Brauchbare Emulsionen unter Verwendung einer Schüttelmaschine konnten nur mit Natriumoleat als Emulgator hergestellt werden. Um auch mit den anderen von uns herangezogenen Emulgatoren stabile Emulsionen herzustellen, bedienten wir uns einer Hurrell-Laboratoriums-Homogenisiermaschine<sup>27)</sup>, die im Mittel eine Tourenzahl von 9000/Min. besitzt. Die Homogenisierung wurde 5-mal hintereinander wiederholt.

### 3. Zusammenhang zwischen Frostwirkung und Oberflächenspannung bzw. Viscosität.

#### A. Eialbumin-Lösungen und -Emulsionen.

Die Kryolyse der Eialbumin-Lösungen wurde in der Weise ausgeführt, daß diese der Frostwirkung a) von verschiedener Dauer, b) wiederholt und c) bei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt wurden.

Tabelle 2a.

Oberflächenspannung von Eialbumin-Lösungen in Dyn/cm, bei 20°, bei verschied. Friedauer.

Konzentrat.	Gefroren bei —18°						Ungefroren
%	2 Stdn.	4 Stdn.	16 Stdn.	24 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.	
0.1	57	58	60	61	61.2	61.9	54.7
0.01	64.9	64.9	65	65	66.3	67.8	62.8
0.001	73.5	73.5	73.6	73.6	74	76.3	70
0.005	60.1	61.3	63	63.9	65.7	69.1	58.4
0.0001	72.8	73	73.9	74.7	76.6	77.9	70.9

<sup>25)</sup> vergl. auch F. F. Nord, Ergebni. d. Enzym-Forsch. 1, 82 (Fußnote) [1932].

<sup>26)</sup> H. R. Kruyt u. H. J. C. Tendeloo, Kolloidchem. Beihefte 29, 400 [1929].

<sup>27)</sup> Für die leihweise Überlassung sind wir der Herstellerin, der Maschinenfabrik Wilh. G. Schröder Nachf. A.-G., Lübeck zu besonderem Dank verpflichtet.

Tabelle 2b.

Oberflächenspannung von Eialbumin-Lösungen in Dyn/cm, bei  $20^{\circ}$ , nach wiederholtem Frieren und verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Unge- froren	Gefroren bei $-18^{\circ}$		
		2-mal je 2 Stdn.	3-mal (2-mal 2 Stdn., 1-mal 48 Stdn.)	
0.1	54.7	57.3		57.5
0.01	62.8	65		65.2
0.001	70	73.5		73.5
0.0001	70.9	73		—

Tabelle 2c.

Oberflächenspannung von Eialbumin-Lösungen in Dyn/cm, bei  $20^{\circ}$ , nach Einwirkung tieferer Temperaturen bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Unge- froren	2 Stdn. bei $-79^{\circ}$	24 Stdn. bei $-79^{\circ}$	2 Stdn. bei $-18^{\circ}$ gefroren
0.1	54.7	65	65	61
0.01	62.8	69.1	69.9	68.4
0.001	70	76	76.1	74.9
0.0001	70.9	78.1	—	77.4

Tabelle 2d.

Tropfenzahl einer Eialbumin-Lösung bzw. -Emulsion, gemessen im Stalagmometer bei  $22^{\circ}$ .

	ungefroren	2 Stdn. gefroren	
		bei $-18^{\circ}$	bei $-79^{\circ}$
2-proz. Lösung .....	48 Tropfen	52 Tropfen	52 Tropfen
Emulsion .....	67 Tropfen	73 Tropfen	74 Tropfen

- a) Aus den in den Tabellen wiedergegebenen und wiederholt kontrollierten Werten geht eindeutig hervor, daß die Oberflächenspannungs-Werte in allen Konzentrationen bei der gleichen Friertemperatur von  $-18^{\circ}$  mit der Frierdauer steigen. Mit sinkender Konzentration steigt sich im allgemeinen die Fähigkeit der Lösungen, ihre Oberflächenspannung zu erhöhen. Dies gilt mit der Einschränkung, daß es 1. in die Tabelle nicht aufgenommene Zwischenkonzentrationen gibt, bei denen die Veränderung der Oberflächenspannung keine meßbaren Unterschiede in bezug auf die nächst höhere Konzentration aufweist, und 2. die Verschiebungen der Oberflächenspannungs-Werte stark verdünnter Eialbumin-Lösungen, wenn sie schon bei den ungefrorenen Lösungen in großer Nähe des Wasser-Wertes liegen, nur einen auch absolut geringeren Anstieg zeigen. — b) Wiederholtes Frieren derselben Lösung bei verschiedener Frierdauer und sogar bei verschiedener Temperatur führt zu keiner Änderung der beim erstmaligen Frieren erreichten Oberflächenspannungs-Werte. — c) Wird eine Lösung z. B. bei  $-79^{\circ}$ , also sehr rasch gefroren, so weist die aufgetauta Lösung unabhängig von der Frierdauer von 2—24 Stdn. keine nennenswerte Erhöhung der gemessenen Oberflächenspannungs-Werte, verglichen mit den Höchstwerten der bei  $-18^{\circ}$  gefrorenen Lösungen gleicher Konzentration, auf. Die erreichten Oberflächenspannungs-Werte sind zum Teil (bei höheren Konzentrationen) nur um ein Geringes höher, zum Teil (bei sinkender Konzentration) auf gleicher Höhe

wie der höchste, bei  $-18^{\circ}$  erreichte Wert. Die Oberflächenspannungs-Werte der bei  $-180^{\circ}$  gefrorenen Lösungen bleiben durchweg unterhalb der Werte, die an bei  $-79^{\circ}$  gefrorenen Lösungen gemessen wurden. — d) Entsprechend der Tatsache, daß sich mit steigender Konzentration die Hydratation der lyophilen Kolloide stets verringert, sehen wir, im richtigen Gegensatz zu den in den obigen Tabellen mitgeteilten Ergebnissen, daß die aus den Tropfenzahlen zu schließenden Oberflächenspannungen durchwegs gesunken sind.

Die Viscositäts-Bestimmungen wurden an einem anderen Teil der selben und ebenso behandelten Lösungen ausgeführt.

Tabelle 3a.

Relative Viscosität von Eialbumin-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	2 Stdn.	4 Stdn.	16 Stdn. bei $-18^{\circ}$ gefroren	24 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.
0.1	1.024	1.033	1.035	1.046	1.051	1.059	1.060
0.01	1.018	1.031	1.033	1.035	1.046	1.049	1.075
0.001	1.016	1.029	1.029	1.040	1.044	1.055	1.072
0.005	1.009	1.011	1.011	1.011	1.012	1.012	1.014
0.0001	1.003	1.016	1.020	1.036	1.042	1.051	1.068

Tabelle 3b.

Relative Viscosität von Eialbumin-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren bei $-18^{\circ}$		
		2-mal je 2 Stdn.	3-mal (2-mal je 2 Stdn., 1-mal 48 Stdn.).	—
0.1	1.024	1.035	1.038	—
0.01	1.018	1.033	1.035	—
0.001	1.016	1.035	1.035	—
0.0001	1.003	1.036	—	—

Tabelle 3c.

Relative Viscosität von Eialbumin-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , nach Einwirkung tieferer Temperaturen bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	2 Stdn. bei $-79^{\circ}$	24 Stdn. bei $-79^{\circ}$	2 Stdn. bei $-180^{\circ}$ gefroren
0.1	1.024	1.090	1.090	1.081
0.01	1.018	1.073	1.075	1.060
0.001	1.016	1.072	1.072	1.059
0.0001	1.003	1.062	—	1.053

Tabelle 3d.

Viscositäten einer Eialbumin-Lösung bzw. -Emulsion bei  $18^{\circ}$ .

	ungefroren	2 Stdn. gefroren	
		bei $-18^{\circ}$	bei $-79^{\circ}$
2-proz. Lösung .....	20.6 sec	20.4 sec	20.2 sec
Emulsion .....	21.4 sec	20.7 sec	21.2 sec

a) In guter Übereinstimmung mit den Oberflächenspannungs-Werten ist aus den in den vorstehenden Tabellen wiedergegebenen Viscositäts-Werten

eine parallele Erhöhung der Viscosität der gefrorenen Lösungen, verglichen mit den ungefrorenen Lösungen, festzustellen. Die Viscositäts-Werte steigen jedoch bei Lösungen sinkender Konzentration nicht (wie die Werte der Oberflächenspannung) stärker. — b) Mehrfaches Frieren verursacht, in Übereinstimmung mit den unveränderten Werten der Oberflächenspannung, keine weitere Änderung der Viscositäts-Werte. — c) Auch in diesem Falle verändern sich die Viscositäts-Werte in Übereinstimmung mit den Oberflächenspannungs-Werten. — d) Die Viscositäts-Werte sinken in Übereinstimmung mit dem Rückgang der aus den Tropfenzahlen zu schließenden Oberflächenspannungs-Werte.

Aus den in den Tabellen 2d und 3d zusammengestellten Werten geht — in Übereinstimmung mit der dort zur Anwendung gelangten Konzentration des Eialbumins und im Gegensatz zu den in den Tabellen 2a—c bzw. 3a—c mitgeteilten Werten von Messungen aus vielfach niedrigeren Konzentrations-Bereichen — hervor, daß sowohl die Oberflächenspannungs- als auch die Viscositäts-Werte sich im Vergleich zu den an den entsprechenden ungefrorenen Lösungen bzw. Emulsionen erhaltenen Werten verringert haben. Dieser Gegensatz ist selbstverständlich, wenn wir die mit steigender Konzentration parallel laufende Verringerung der Hydratation in Betracht ziehen. Bereits in unseren früheren Versuchen über die Gasverzehrung<sup>28)</sup> bzw. den Einfluß von Gasen auf die Oberflächenspannung usw. lyophiler Kolloide<sup>29)</sup> haben wir darauf hingewiesen, daß der Anstieg der Teilchengröße mit einer Oberflächen-Verringerung parallel geht. Die durch den Frost bewirkte Disaggregation-Aggregation kolloider Teilchen ist in diesem Konzentrations-Bereich, entsprechend der zunehmenden Assoziation der kolloiden Eialbumin-Teilchen, wesentlich zugunsten der Aggregation verschoben, dies um so eher, wenn wir der Staudingerschen<sup>30)</sup> Auffassung beipflichten, daß die Eiweiß-Kolloide lediglich Riesenmoleküle von kolloidem Ausmaß darstellen, d. h. nicht micellar sind. Eine etwaige Aggregation kann natürlich bis zu einer Koagulation fortschreiten, und dementsprechend wird die gesunkene Oberflächenspannung von einer gesunkenen Viscosität begleitet sein. Diese Verhältnisse werden am besten durch das Abbildungspaar Fig. 1 und 2 illustriert. Die beiden Aufnahmen stellen Mikro-photogramme<sup>31)</sup> etwa 100-fach vergrößerter Emulsionen dar. Abbild. 1 gibt die Teilchen der mit einem bei  $-79^{\circ}$  gefrorenen und wieder aufgetauten Emulgator hergestellten Emulsion, und Abbild. 2 gibt die Teilchen der mit einem ungefrorenen Emulgator hergestellten Emulsion wieder. Die infolge Vergrößerung der Tröpfchen offenkundige Oberflächen-Verringerung ist ohne weiteres zu ersehen.

Bevor wir in die Besprechung der an anderen Kolloiden erhaltenen Ergebnisse eintreten, sei mit Rücksicht auf die späteren theoretischen Erörterungen darauf hingewiesen, daß die Stammlösungen bei längerem Stehen einen geringen, aber gut messbaren Anstieg der Oberflächenspannungs-Werte aufweisen, ohne jedoch den Wasser-Wert auch bei den stärksten Verdünnungen

<sup>28)</sup> Ztschr. physikal. Chem. (A) **150**, 12 [1930]; Transact. Faraday Soc. **26**, 760 [1930].

<sup>29)</sup> Auf diese Verhältnisse bzw. den Einfluß der Teilchengröße auf die Diffusion in Verbindung mit der Kryolyse auch einfacherer chemisch definierter Verbindungen wird noch zurückzukommen sein. <sup>30)</sup> H. Staudinger, B. **62**, 2893 [1929].

<sup>31)</sup> Für die Anfertigung dieser und der nachfolgenden Mikro-photogramme sind wir der I.-G. Farbenindustrie A.-G. (Agfa) zu besonderem Dank verpflichtet.

— im Gegensatz zu der Aussage von Clark und Mann<sup>32)</sup> — jemals zu überschreiten, und daß sich eine nach dem Gefrieren aufgetaute Eialbumin-Lösung im Aussehen in keiner Weise von der Stammlösung unterscheidet.

### B. Gelatine-Lösungen.

Die Kryolyse der Gelatine-Lösungen wurde unter den gleichen Bedingungen wie die der Eialbumin-Lösungen ausgeführt.

Tabelle 4a.

Oberflächenspannung von Gelatine-Lösungen in Dyn/cm bei 20°, bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren bei —18°				
		2 Stdn.	4 Stdn.	16 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.
0.5	50.2	52.9	52.9	53.1	53.8	54.2
	69.3	70	70.2	70.5	72	74.6
0.01	59.7	61.9	62.1	63.3	63.3	64.1
	70	70.6	70.9	71	71.9	75.8
0.001	67.3	69.8	70.1	70.9	71.7	75.3
	73.4	73.8	73.9	73.9	74.5	76.6
0.0001	75.9	76.6	76.6	76.9	77.3	77.6

Tabelle 4b.

Oberflächenspannung von Gelatine-Lösungen in Dyn/cm bei 20°, nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren bei —18°		
		2-mal je 2 Stdn.	3-mal (2-mal je 2 Stdn., 1-mal 48 Stdn.)	
0.5	50.2	53	53	
	69.3	70	70.2	
0.01	59.7	62	62.1	
	70	70.9	70.9	
0.001	67.3	70	70	

Tabelle 4c.

Oberflächenspannung von Gelatine-Lösungen in Dyn/cm, bei 20°, nach Einwirkung tieferer Temperaturen bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren		
		2 Stdn. bei —79°	24 Stdn. bei —79°	2 Stdn. bei —180°
0.5	50.2	53.8	53.9	53
	69.3	74.6	75	73.5
0.01	59.7	—	—	62.3
	70	74.5	75	73.6
0.001	67.3	—	—	70.8
	73.4	76.5	—	75.9
0.0001	75.9	77.3	77.3	76

a) und b). Die in diesen Tabellen wiedergegebenen Veränderungen der Oberflächenspannungs-Werte bzw. Richtungen der Veränderungen entsprechen vollkommen den Werten, die in den Tabellen der Oberflächen-

<sup>32)</sup> G. L. Clark u. W. A. Mann, Journ. biol. Chem. 52, 180 [1922]; vergl. auch Ying Fu u. Hsien Wu, Proceed. Soc. exp. Biol. Med. 27, 878 [1930].

spannungs-Werte für Eialbumin-Lösungen mitgeteilt sind, mit der Einschränkung, daß die absolute Erhöhung der Oberflächenspannungs-Werte etwas geringer ist. Dementsprechend ist bei sinkender Konzentration die Steigerung geringer. Das gleiche trifft auch für die Folgen des wiederholten Frierens zu. Die schon bei den Eialbumin-Lösungen erwähnte Beobachtung, daß die ungefrorenen Lösungen bei längerem Stehen einen Anstieg der Oberflächenspannungs-Werte zeigen, bestätigte sich an den Gelatine-Lösungen und traf hier in noch höherem Maße zu. In dieser Tabelle sind die Oberflächenspannungs-Werte der Lösungen am Anfang und am Ende der Versuchs-Periode aufgenommen. Es läßt sich daraus klar ersehen, daß 1. mit der Zeit eine nicht unwesentliche Erhöhung der Oberflächenspannungs-Werte der ungefrorenen Lösungen erfolgt ist, und daß 2., je näher der Oberflächenspannungs-Wert der ungefrorenen Lösungen zu dem Oberflächenspannungs-Wert des Wassers liegt, um so weniger infolge der Frostwirkung eine weitere Erhöhung der Oberflächenspannungs-Werte eintritt. — c) Die Oberflächenspannungs-Werte, die nach dem raschen Ausfrieren der Lösung bei  $-79^{\circ}$  bzw. bei  $-180^{\circ}$  beobachtet wurden, erreichen die höchsten Werte, die an bei  $-18^{\circ}$  gefrorenen Lösungen gemessen wurden, nicht.

Aus der unten folgenden Zusammenstellung der Ergebnisse der Viscositätsmessungen an Gelatine-Lösungen geht eindeutig hervor, daß sowohl im

Tabelle 5a.

Relative Viscosität von Gelatine-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren bei $-18^{\circ}$				
		2 Stdn.	4 Stdn.	16 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.
0.5	1.160	1.153	1.153	1.144	1.082	1.077
0.01	1.091	1.078	1.048	1.029	1.025	1.025
0.001	1.062	1.042	1.040	1.030	1.025	0.990
0.0001	0.994	0.977	0.975	0.961	0.955	0.903

Tabelle 5b.

Relative Viscosität von Gelatine-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren bei $-18^{\circ}$		
		2-mal je 2 Stdn.	3-mal (2-mal je 2 Stdn., 1-mal 48 Stdn.)	
0.5	1.160	1.153	1.151	
0.01	1.091	1.052	1.049	
0.001	1.062	1.025	1.025	
0.0001	0.994	0.977	0.974	

Tabelle 5c.

Relative Viscosität von Gelatine-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , nach Einwirkung tieferer Temperaturen bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Ungefroren	Gefroren		
		2 Std. bei $-79^{\circ}$	24 Stdn. bei $-79^{\circ}$	2 Stdn. bei $-180^{\circ}$
0.5	1.160	1.077	1.077	1.086
0.01	1.091	1.026	—	1.043
0.001	1.062	0.995	—	1.008
0.0001	0.994	0.918	—	0.947

Gegensatz zur Steigerung der Oberflächenspannungs-Werte als auch zur Steigerung der Viscositäts-Werte bei den Eialbumin-Lösungen die Viscositäts-Werte der gefrorenen Gelatine-Lösungen durchweg unter den Werten der ungefrorenen Stammlösung liegen. Wiederholtes Frieren und auch Frieren bei tieferen Temperaturen verursacht keine weitere Veränderung der Viscositäts-Werte; in diesem Punkt stimmen die Beobachtungen bei Gelatine-Lösungen und bei Eialbumin-Lösungen miteinander überein.

### C. Gummi-arabicum-Lösungen und -Emulsionen.

Tabelle 6a.

Oberflächenspannung von Gummi-arabicum-Lösungen in Dyn/cm bei 20° bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Unge- froren schwankend	Gefroren bei —18°				
		2 Stdn.	16 Stdn.	24 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.
0.1	64—70	71	71.9	72.5	72.7	72.9
0.01	72.5	73	73.7	74.8	75	77.5
0.001	73.3	74.1	74.5	75.1	75.9	78.3
7	61.5	63.1	63.7	63.9	64.8	68.2
	69	70	—	—	71.1	71.5

Tabelle 6b.

Oberflächenspannung von Gummi-arabicum-Lösungen in Dyn/cm bei 20°, nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Unge- froren	2-mal (je 1-mal 2 Stdn. und 48 Stdn.) bei —18° gefroren	
		2 Stdn.	48 Stdn.
0.1	64—70	71.2	
0.01	72.5	73.2	
0.001	73.3	74.3	
7	61.5	63.5	

Tabelle 6c.

Oberflächenspannung von Gummi-arabicum-Lösungen in Dyn/cm bei 20° nach Einwirkung tieferer Temperaturen bei verschiedener Friedauer.

Konzentrat. %	Un- gefroren	Gefroren		
		2 Stdn. bei —79°	24 Stdn. bei —79°	2 Stdn. bei —18°
0.1	64—70	77.7	77.7	76.9
0.01	72.5	77.2	77.2	77
0.001	73.3	78.1	—	77.6
7	61.5	67.9	68	67.1

Tabelle 6d.

Tropfenzahl einer Gummi-arabicum-Lösung bzw. -Emulsion, gemessen im Stalagmometer bei 22°.

	un- gefroren	2 Stdn. gefroren	
		bei —18°	bei —79°
2-proz. Lösung ..	45 Tropfen	44 Tropfen	43 Tropfen
Emulsion .....	61 Tropfen	60 Tropfen	57 Tropfen

Tabelle 7a.

Relative Viscosität von Gummi-arabicum-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$ , bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat.	Un-	Gefroren bei $-18^{\circ}$				
		gefroren	2 Stdn.	16 Stdn.	24 Stdn.	31 Stdn.
0.1	1.062	1.038	1.032	1.012	1.002	0.989
0.01	1.028	1.028	1.019	1.012	1.009	0.955
0.001	1.019	1.012	1.009	1.007	1.003	0.956
7	3.606	3.510	3.480	—	3.279	3.259

Tabelle 7b.

Relative Viscosität von Gummi-arabicum-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$  nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat.	Un-	2-mal (je 1-mal 2 Stdn. und 48 Stdn.)	
		gefroren	bei $-18^{\circ}$ gefroren
0.1	1.062	1.062	1.062
0.01	1.028	1.028	1.022
0.001	1.019	1.019	1.009
7	3.606	3.606	3.479

Tabelle 7c.

Relative Viscosität von Gummi-arabicum-Lösungen bei  $22.2^{\circ}$  nach Einwirkung tieferer Temperaturen bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat.	Un-	Gefroren		
		2 Stdn.	24 Stdn.	2 Stdn.
0.1	1.062	0.994	0.994	0.996
0.01	1.028	0.964	0.952	0.969
0.001	1.019	1.003	—	0.956
7	3.606	3.885	3.884	3.887

Tabelle 7d.

Viscosität einer Gummi-arabicum-Lösung bzw. -Emulsion bei  $18^{\circ}$ .

	un-	2 Stdn. gefroren	
		gefroren	bei $-18^{\circ}$
2-proz. Lösung ...	36.4 sec	36.8 sec	37.6 sec
Emulsion .....	35.6 sec	36.2 sec	38.4 sec

Die an gefrorenen Gummi-arabicum-Lösungen gemachten Beobachtungen hinsichtlich der Veränderungen der Werte der Oberflächenspannung bzw. Viscosität entsprechen in qualitativer Beziehung den an Gelatine-Lösungen gemachten Feststellungen. Lediglich die Viscositäts-Werte der konz. Gummi-Lösungen, sowie die der betreffenden Emulsionen bewegen sich in entgegengesetzter Richtung. Bei allen Lösungen konnten die Messungen einwandfrei reproduziert werden, mit Ausnahme der 0.1-proz. ungefrorenen Lösung, die starke, aber unter dem Einfluß des Frostes aufhörende Schwankungen aufwies.

#### D. Saponin-Lösungen und -Emulsionen.

Tabelle 8.

Tropfenzahlen einer Saponin-Lösung bzw. -Emulsion, gemessen im Stalagmometer bei  $22^{\circ}$ .

	un-	2 Stdn. gefroren	
		gefroren	bei $-18^{\circ}$
2-proz. Lösung ...	55 Tropfen	51 Tropfen	49 Tropfen
Emulsion .....	75 Tropfen	65 Tropfen	62 Tropfen

Tabelle 9.

Viscosität einer Saponin-Lösung bzw. -Emulsion bei 18°.

	un- gefroren	2 Stdn. gefroren bei —18°	2 Stdn. gefroren bei —79°
2-proz. Lösung ...	19.8 sec	20.2 sec	20.6 sec
Emulsion .....	20.2 sec	23.4 sec	20.7 sec

Sowohl die aus den Tropfenzahlen zu schließenden Oberflächenspannungswerte als auch die Viscositäts-Werte zeigen bei den Lösungen wie bei den mit ihnen hergestellten Emulsionen ein Ansteigen, verglichen mit den betreffenden Werten der ungefrorenen Ausgangspräparate.

Nach den Mikro-photogrammen (Fig. 3 und 4) zu urteilen, die mit bei —79° gefroren gewesenen bzw. mit ungefrorenen Saponin-Lösungen hergestellte Emulsions-Tröpfchen darstellen, hat sich die Oberfläche der ersten um ein Mehrfaches vergrößert.

## E. Natriumoleat-Lösungen und -Emulsionen.

Tabelle 10a.

Oberflächenspannung von Natriumoleat-Lösungen in Dyn/cm bei 20° bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Un- gefroren	Gefroren bei —18°					
		2 Stdn.	4 Stdn.	16 Stdn.	24 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.
5	52	52.8	52.9	53.5	53.7	54.1	54.9
0.1	30.5	31.9	33.1	33.1	34	34.5	34.5
0.01	36.1	38	38.7	39.1	40.4	42	42
0.001	39.9	42	42	42.5	42.7	43.1	44
0.0001	60.2	62	62.1	62.9	63.5	63.7	64.6

Tabelle 10b.

Oberflächenspannung von Natriumoleat-Lösungen in Dyn/cm bei 20° nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat. %	Un- gefroren	Gefroren bei —18°		
		2-mal je 2 Stdn.	3-mal (2-mal je 2 Stdn., 1-mal 48 Stdn.)	48 Stdn.
5	52	52.8	52.8	52.8
0.1	30.5	32.1	32.1	32.1
0.01	36.1	39.1	39.1	39.1
0.001	39.9	42	42	42
0.0001	60.2	62.1	62.1	62.1

Tabelle 10c.

Oberflächenspannung von Natriumoleat-Lösungen in Dyn/cm bei 20° nach Einwirkung tieferer Temperaturen.

Konzentrat. %	Un- gefroren	2 Stdn.		2 Stdn.	
		bei —79° gefroren	bei —18° gefroren	bei —79° gefroren	bei —18° gefroren
5	52	54	54	54	54
0.1	30.5	34.5	34.5	34.5	34.1
0.01	36.1	42.4	42.4	42.4	41.1
0.001	39.9	44	44	44	42.5
0.0001	61.2	64.2	64.2	64.2	63.9

Tabelle Iod.

Tropfenzahl einer Natriumoleat-Lösung bzw. -Emulsion, gemessen im Stalagmometer bei 22°.

	un- gefroren	2 Stdn. gefroren bei —18°	2 Stdn. gefroren bei —79°
2-proz. Lösung ...	143 Tropfen	140 Tropfen	142 Tropfen
Emulsion .......	99 Tropfen	97 Tropfen	99 Tropfen

Tabelle IIa.

Relative Viscosität von Natriumoleat-Lösungen bei 22.2° bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat.	Un- gefroren	Gefroren bei —18°				
%	2 Stdn.	4 Stdn.	16 Stdn.	24 Stdn.	31 Stdn.	48 Stdn.
5	2.521	2.149	2.149	2.144	2.144	2.144
0.1	1.038	1.038	1.038	1.035	1.035	1.033
0.01	1.020	1.020	1.022	1.022	1.024	1.025
0.001	1.016	1.016	1.016	1.031	1.031	1.031
0.0001	0.979	0.979	0.979	0.959	0.957	0.944

Tabelle IIb.

Relative Viscosität von Natriumoleat-Lösungen bei 22.2° nach wiederholtem Frieren bei verschiedener Frierdauer.

Konzentrat.	Un- gefroren	2-mal (je 1-mal 2 Stdn. und 48 Stdn.) bei —18° gefroren
%		
0.1	1.038	1.038
0.01	1.020	1.020
0.001	1.016	1.016

Tabelle IIc.

Relative Viscosität von Natriumoleat-Lösungen bei 22.2° nach Einwirkung tieferer Temperaturen.

Konzentrat.	Un- gefroren	2 Stdn. bei —79° gefroren	2 Stdn. bei —180° gefroren
%			
5	2.521	2.975	3.133
0.1	1.038	1.033	1.035
0.01	1.020	1.025	1.024
0.001	1.016	1.035	1.031
0.0001	0.979	0.942	0.940

Tabelle IID.

Viscosität einer Natriumoleat-Lösung bzw. -Emulsion bei 18°.

	un- gefroren	2 Stdn. gefroren bei —18°	2 Stdn. gefroren bei —79°
2-proz. Lösung ...	19.4 sec	19.6 sec	20.0 sec
Emulsion .......	20.6 sec	21.2 sec	22.0 sec

Die Erhöhung der Oberflächenspannungs-Werte infolge der Frostwirkung ist, verglichen mit den Werten der Eialbumin-, Gelatine- und Gummi-Lösungen, absolut geringer; auch ist die nach der Frostwirkung eintretende Erhöhung der Oberflächenspannungs-Werte in allen Konzentrationen ungefähr die

gleiche. Gegenüber den bei der Messung der Oberflächenspannungs-Werte von Eialbumin-Lösungen festgestellten üblichen Schwankungen<sup>33)</sup> der Meßwerte sei darauf hingewiesen, daß die Messungen von Natriumoleat-Lösungen auch innerhalb der Fehlergrenze unveränderliche Werte liefern. Die Viscositäts-Werte ergeben kein einheitliches Bild. Um etwa sichtbare Unterschiede in der Veränderung der Oberfläche feststellen zu können, haben wir von den Emulsionen, die mit bei  $-79^{\circ}$  gefrorenen bzw. ungefrorenen 1-proz. Natriumoleat-Lösungen hergestellt wurden, Mikrophotogramme (Fig. 5 und 6) aufgenommen. In Übereinstimmung mit den unwesentlichen, durch die Frostwirkung hervorgerufenen Verschiebungen der Oberflächenspannungs-Werte und den streuenden Viscositäts-Werten ist bei der von uns hier angewandten etwa 100-fachen Vergrößerung eine Veränderung der Oberfläche der Emulsions-Teilchen kaum festzustellen.

Ist man also geneigt, die Forderung Donnans<sup>34)</sup>, nach welcher in einer Emulsion sich die als Emulgator wirkende Seife in der Oberflächenschicht Öl/Wasser konzentrieren soll, auch in unseren Fällen als erfüllt anzusehen, so wird sich im Augenblick auf Grund der hier mitgeteilten Meßergebnisse keine Entscheidung darüber treffen lassen, ob in der Grenzphase die Aggregate des Natriumoleats beim gefrorenen oder ungefrorenen Emulgator, oder umgekehrt, größer oder kleiner sind.

Durch einen äußerst auffallenden Unterschied kennzeichnet sich jedoch das Verhalten auf der einen Seite der Proteine bzw. des Gummi arabicums und andererseits des Natriumoleats gegenüber insbesondere rasch einsetzender Frostwirkung. Wie aus Figur 7 eindeutig hervorgeht, weist eine z. B. bei  $-180^{\circ}$  gefrorene Natriumoleat-Lösung eine deutlich meßbare Volum-Verminderung auf, wogegen der von der gefrorenen Eialbumin-Lösung im Reagensglas eingenommene Raum keine mit dem Auge wahrnehmbare Veränderung zeigt.

#### 4. Erörterung.

Um die mitgeteilten Versuchs-Ergebnisse verstehen bzw. einer befriedigenden Erklärung zuführen zu können, müssen wir daran erinnern, daß aus den in den Tabellen (der Eialbumin-Lösungen) za-c wiedergegebenen Messungswerten klar hervorgeht, daß der Wiederanstieg der Oberflächenspannung einer gefrorenen, verdünnten Eialbumin-Lösung zum Oberflächenspannungs-Wert des Wassers absolut größer ist als der einer gefrorenen konzentrierteren Eialbumin-Lösung.

Aus der Tatsache, daß sich die Oberflächenspannungen sämtlicher verdünnter kolloider Lösungen bei allen Temperaturen, bei denen ihre Kryolyse durchgeführt worden ist, beträchtlich erhöhen, wäre es zunächst naheliegend, auf Grund mancher Befunde in der Biochemie bzw. Kolloidchemie die Ursache der von uns gefundenen physikalischen Veränderungen z. T. in der Dehydratation der Kolloidteilchen zu erblicken. Die bereits von Göppert<sup>34a)</sup> angenommene Dehydratisierung kommt — wenn überhaupt — bei langsam einsetzender Frostwirkung auf Zellsysteme in Frage, indem durch das Frieren eine Konzentrierung der Kolloide mit nachfolgender

<sup>33)</sup> vergl. P. Le comte Du Noüy, Equilibres superficiels des solutions colloïdales, Paris 1929. <sup>34)</sup> F. G. Donnan, Ztschr. physikal. Chem. 31, 48 [1899].

<sup>34a)</sup> H. R. Göppert, Über die Wärme-Entwicklung in den Gewächsen und die Erscheinungen beim Gefrieren derselben. Breslau 1830.

Fällung der Proteine des Protoplasmas und deren Folgeerscheinungen bewirkt wird. Hieraus können wir aber die Tatsache des Anstieges der Oberflächenspannung und der gleichzeitigen Erhöhung der Gärwirkung einer gefroren gewesenen Zymase-Lösung nur schwer verstehen. Es erhebt sich daher die Frage, ob nicht als Folge der Frostwirkung, unbeschadet der nicht gleichsinnigen Veränderung der Viscositäts-Werte einiger Lösungen, die Verkleinerung der kolloiden Teilchen und dementsprechend die Vergrößerung ihrer Oberfläche zu erörtern wäre. Daraus könnte sich nämlich ergeben, daß die absolute Annäherung des Oberflächenspannungs-Wertes einer der Einwirkung des Frostes ausgesetzten Lösung eines lyophilen Kolloids an den Wasser-Wert um so größer ist, je größer, entsprechend der höheren Konzentration der Lösung, die neu entstandene Gesamtoberfläche der kolloiden Teilchen ist. Das Gegenteil scheint aber der Fall zu sein. Die Annäherung der Oberflächenspannungs-Werte der gefrorenen Lösungen eines lyophilen Kolloids steht im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration. Zur Erklärung dieser Erscheinung könnten wir annehmen, daß der Wert der Oberflächenspannung einer kolloiden Lösung einen Mischwert darstellt, in dem die eine Komponente aus dem Wert der Oberflächenspannung des Wassers, die andere Komponente aus der Oberflächenspannung der kolloiden Teilchen besteht.

Bevor wir auf die Folgerungen aus dieser Voraussetzung eingehen, müssen wir darauf hinweisen, daß, entsprechend unseren gegenwärtigen Vorstellungen über die Rolle des Wassers in kolloiden bzw. lebenden Systemen, in diesem Wasser selbst ein Gleichgewicht zwischen „gebundenem“ Wasser und „freiem“ Wasser besteht. In einer größeren Reihe von Arbeiten ist es im Laufe des letzten Jahrzehnts der Gortnerschen Schule gelungen, diese von Gortner<sup>35)</sup> unabhängig von Balcar, Sansum und Woodyatt aufgestellte Hypothese durch experimentelle Untersuchungen zu unterstützen, so daß wir nunmehr unter „freiem“ Wasser denjenigen Teil des vorgenannten Gleichgewichts-Systems verstehen könnten, der die Fähigkeit besitzt, die Rolle eines Lösungsmittels zu übernehmen, wogegen das „gebundene“ Wasser diese Fähigkeit verloren hat. In neuerer Zeit glaubt man<sup>36)</sup> sogar, den Beweis erbracht zu haben, daß, während die Dielektrizitätskonstante des „freien“ Wassers 80 beträgt, diejenige des in den Kolloiden „gebundenen“ Wassers auf 2–3 gesunken sein soll, und daß somit dieses „gebundene“ Wasser kein Dipolmoment besitzt. Genauer genommen würde also die Oberflächenspannung einer lyophil-kolloiden Lösung durch drei Faktoren bestimmt sein, nämlich a) durch die Oberflächenspannung des kolloiden Teilchens und b) bzw. c) durch die Oberflächenspannung der beiden Bestandteile des Wasser-Systems. Auch aus den hiesigen Befunden geht hervor, daß, verglichen mit der Oberflächenspannung einer wäßrigen Lösung eines lyophilen Kolloids, der Wert der Oberflächenspannung des reinen Wassers am höchsten ist. Dieser Wert der Oberflächenspannung erniedrigt sich im Verhältnis zum Anstieg der Konzentration des Kolloids, und zwar in dem Ausmaße, in dem sich das Gleichgewicht zwischen „gebundenem“ und „freiem“ Wasser gemäß der Konzentration der Teilchen verschoben hat. Unter der Voraussetzung, daß die Ursache des

<sup>35)</sup> R. A. Gortner, Outlines of Biochemistry (New York, 1929), S. 230ff.; Transact. Faraday Soc. **26**, 678 [1930].

<sup>36)</sup> N. Marinesco, Journ. Chim. Phys. **28**, 85 [1931].

Wertanstiegs der Oberflächenspannung auf einer Verkleinerung der lyophil-kolloiden Teilchen beruht, dürfte die verschiedene, absolute Erhöhung der Oberflächenspannung von Lösungen verschiedener Konzentration nunmehr leichter zu verstehen sein. Vergrößert sich nämlich unter der Frostwirkung die Oberfläche der lyophil-kolloiden Teilchen in einer konzentrierteren Lösung, so wird einerseits der Wert der Oberflächenspannung der Teilchen absolut größer, aber gleichzeitig adsorbieren die vergrößerten Oberflächen mehr Wasser. Das Gleichgewichts-Verhältnis „gebundenes“ Wasser  $\rightleftharpoons$  „freies“ Wasser wird zuungunsten der freien Komponente verschoben. Dementsprechend erhöht sich die Oberflächenspannung nur in dem Ausmaße, wie dies den Unterschied zwischen dem Wert der Oberflächenspannung der Teilchen und der Oberflächenspannung des Wassers entspricht. In verdünnten Lösungen sind demgegenüber weniger Teilchen vorhanden. In Übereinstimmung hiermit ist das Sinken des Oberflächenspannungs-Wertes von reinem Wasser durch die geringere Anzahl vorhandener Teilchen bei ungefrorenen, verdünnten Lösungen geringer und die nach der Neu-Einwirkung des Frostes entstandene Oberfläche absolut kleiner. Demgemäß ist auch die zusätzlich gebundene Wasser-Menge geringer und der Unterschied zwischen der Oberflächenspannung der Teilchen und der Oberflächenspannung des Wassers kleiner. Damit übereinstimmend wirkt die Teilnahme der höherwertigen Komponente (freies Wasser) dahin, daß die Erhöhung der Oberflächenspannung bei verd. Lösungen absolut größer ist. Nach diesen Ausführungen erscheint die einleitend gemachte Annahme, daß der Frost auf lyophile Kolloide dis-aggregierend und somit oberflächen-vergrößernd wirkt, nicht mehr unerklärlich.

Die hiermit gleichsinnig verlaufende Erhöhung der Viscositäts-Werte bei den verdünnten Eialbumin-Lösungen befindet sich mit den vorstehenden Ausführungen in gutem Einklang; die Möglichkeit und Ursache einer nicht gleichsinnig gerichteten Veränderung der Oberflächenspannungs-Werte bzw. der Viscositäts-Werte, wie wir sie bei Gummi- und Gelatine-Lösungen gefunden haben, ist bereits einleitend (S. 1150) berücksichtigt worden.

Für das Vorhandensein von gebundenem Wasser bei den kolloiden Lösungen der Eiweißkörper bzw. von Gummi arabicum spricht auch die durch Fig. 7 belegte wichtige Beobachtung, nach der die genannten Lösungen unter der Einwirkung des Frostes, im Gegensatz zu einer gefrorenen Natriumoleat-Lösung, keine sichtbaren Volum-Verminderungen erleiden. Es ist anzunehmen, daß unter der Einwirkung des Frostes eine Separation zwischen dem freien Wasser und dem System (kolloides Teilchen + gebundenes Wasser) stattfindet, d. h. daß das lyophile Kolloid nicht nur irreversible Veränderungen seiner physikalischen Eigenschaften erleidet, sondern daß das gebundene oder Hülle-Wasser infolge der Capillarkräfte, wenn überhaupt in gewöhnlichem Sinne, zweifelsohne langsamer friert; d. h. der Gefrierprozeß setzt bei dem freien Wasser ein. Mit anderen Worten (und dies tritt am schärfsten bei rascher Abkühlung ein) bleibt das gebundene Wasser als Adsorptions-Hülle bestehen, da es seine Fähigkeit, in den polaren Zustand überzugehen, eingebüßt hat. Hierdurch bleiben die Räume, die durch den Übergang des freien Wassers in den krystallisierten Zustand entstehen, ausfüllt, und eine Schrumpfung unterbleibt. Daraus und aus den Tatsachen, daß a) durch das Gefrieren einer Natriumoleat-Lösung eine meßbare Volum-Verminderung hervorgerufen wird, b) andererseits, daß die Erhöhung der

Oberflächenspannungs-Werte der gefrorenen Natriumoleat-Lösungen verschiedener Konzentration keinen nennenswerten Unterschied aufweist, c) daß auch die absolute Erhöhung der Oberflächenspannungs-Werte, verglichen mit den an Eialbumin-Lösungen gemessenen Werten, geringer ist, und d) das Auftauen einer Seifen-Lösung unter den gleichen Bedingungen unvergleichlich rascher vor sich geht als das Auftauen einer Protein-Lösung, könnte der Schluß gezogen werden, daß das gebundene Wasser bei einer Seife (entsprechend auch den Tatsachen, daß die „Neutralteilchen“ an ihrer Oberfläche eine ausgiebige Anzahl elektrischer Ladungen tragen bzw. im Vergleich mit dem Eialbumin das Molekulargewicht wesentlich kleiner ist) eine untergeordnetere Bedeutung hat<sup>36a)</sup>.

In Anbetracht der Wichtigkeit, die lyophilen Kolloiden in biologischen Vorgängen zukommt, werden Schlüsse, die aus mit Seifen ausgeführten Modellversuchen auf diese Vorgänge gezogen werden, dieser Feststellung entsprechend zu werten sein. Die interessanten Beobachtungen von z. B. Clowes<sup>37)</sup>, der eine Seife in der Zellwand als Emulgator annimmt, wurden aber schon früher, auch aus anderen Gründen, von Seifriz<sup>38)</sup> bzw. Nord<sup>39)</sup> als unwahrscheinlich angesehen.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die Annahme, durch die Einwirkung des Frostes auf lyophile Kolloide eine irreversible physikalische Veränderung hervorgerufen zu haben, auch dadurch berechtigt erscheint, daß durch wiederholtes Frieren praktisch keinerlei Unterschiede in den Viscositäts- bzw. Oberflächenspannungs-Werten festgestellt werden konnten.

### 5. Einfluß der Frostwirkung auf die Leitfähigkeit und kataphoretische Wanderungs-Geschwindigkeit.

In den oben mitgeteilten Versuchen bzw. deren Erörterung glauben wir, die früher aufgestellte Hypothese, nach der die Veränderung der Oberflächenspannung bzw. der Viscosität einer der Frostwirkung ausgesetzten lyophil-kolloiden Lösung auf die Disaggregation-Aggregation ihrer Teilchen zurückzuführen ist, weiter gestützt zu haben. Folgerichtig ist hieraus bei Enzym-Lösungen, die sich gleichfalls als Lösungen verd. lyophiler Kolloide verhalten, sich aber nach eingetretener Frostwirkung vorübergehend als höher wirksam, insgesamt aber als dauernder wirksam, erwiesen haben, angenommen worden, daß die unter dem Einfluß der Frostwirkung neu entstandene kombinierte Träger-Enzym-Oberfläche dem Einfluß z. B. der Proteolyse oder Zellstoffwechselprodukten gegenüber, empfindlicher ist, aber durch Adsorption z. B. von Gasen geschützt werden kann (Protektor-Wirkung). Die experimentelle Bestätigung hierfür ist in einer unserer früheren Mitteilungen niedergelegt worden.

Um die experimentellen Grundlagen unserer Auffassung zu verdichten, war es naheliegend, sowohl die Leitfähigkeit der Frostwirkung ausgesetzter lyophiler kolloider Lösungen bzw. Emulsionen als auch die kataphoretische

<sup>36a)</sup> Es sei darauf hingewiesen, daß sich im Röntgenspektrum von Seifengallerten keine Änderungen mit dem Wassergehalt nachweisen lassen (J. R. Katz u. J. C. Derkson, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 51, 514 [1932]).

<sup>37)</sup> G. H. A. Clowes, Journ. physical. Chem. 20, 407 [1916].

<sup>38)</sup> W. Seifriz, Science 57, 694 [1923].

<sup>39)</sup> F. F. Nord, Protoplasma 2, 301 [1927].

Wanderungs-Geschwindigkeit lyophil-kolloider Teilchen im elektrischen Felde zu messen.

Tabelle 12.

Spezif. Leitfähigkeiten von gefrorenen und ungefrorenen Eialbumin-, Gelatine-<sup>39a)</sup>, Gummi-arabicum- und Natriumoleat-Lösungen, bei 22°.

Konzentrat. der Lösung %	ungefroren	2 Stdn. bei -18°	48 Stdn. bei -18°	2 Stdn.	
				bei -79°	bei -180°
		gefroren			
Eialbumin 0.01	$1.103 \times 10^{-5}$	$1.480 \times 10^{-5}$	$1.863 \times 10^{-5}$	$1.125 \times 10^{-5}$	$1.125 \times 10^{-5}$
Eialbumin 0.1	$1.110 \times 10^{-5}$	$1.016 \times 10^{-4}$	$1.110 \times 10^{-5}$	$8.589 \times 10^{-6}$	$8.589 \times 10^{-6}$
Gelatine 0.5	$8.192 \times 10^{-6}$	—	$8.192 \times 10^{-6}$	—	$7.946 \times 10^{-6}$
Gummi 0.01	$1.081 \times 10^{-5}$	—	$4.307 \times 10^{-5}$	$1.182 \times 10^{-5}$	$1.182 \times 10^{-5}$
Gummi 0.1	$2.681 \times 10^{-5}$	—	—	$2.381 \times 10^{-5}$	$2.381 \times 10^{-5}$
Natrium- oleat 0.001	$8.609 \times 10^{-6}$	$1.058 \times 10^{-5}$	$7.403 \times 10^{-5}$	—	$7.403 \times 10^{-5}$
Natrium- oleat 0.1	$1.699 \times 10^{-4}$	—	$1.122 \times 10^{-4}$	$1.122 \times 10^{-4}$	$1.122 \times 10^{-4}$

Tabelle 13.

Spezif. Leitfähigkeit von gefrorenen und ungefrorenen 2-proz. Eialbumin-, Gummi-arabicum-, Saponin-, Natriumoleat-Lösungen bzw. den damit hergestellten Emulsionen bei 18°.

	ungefroren	2 Stdn. gefroren	
		bei -18°	bei -79°
Eialbumin .....	$1.977 \times 10^{-3}$	$2.000 \times 10^{-3}$	$2.142 \times 10^{-3}$
Emulsion .....	$1.191 \times 10^{-3}$	$1.989 \times 10^{-3}$	$2.102 \times 10^{-3}$
Gummi arabicum .....	$3.484 \times 10^{-4}$	$3.424 \times 10^{-4}$	$3.208 \times 10^{-4}$
Emulsion .....	$3.444 \times 10^{-4}$	$3.362 \times 10^{-4}$	$3.405 \times 10^{-4}$
Saponin .....	$5.795 \times 10^{-4}$	$5.370 \times 10^{-4}$	$5.641 \times 10^{-4}$
Emulsion .....	$5.793 \times 10^{-4}$	$5.672 \times 10^{-4}$	$5.432 \times 10^{-4}$
Natriumoleat .....	$1.360 \times 10^{-3}$	$1.310 \times 10^{-3}$	$1.245 \times 10^{-3}$
Emulsien .....	$1.066 \times 10^{-3}$	$1.068 \times 10^{-3}$	$9.845 \times 10^{-4}$

Aus den Tabellen geht hervor, daß in Übereinstimmung mit dem Einfluß der Konzentration die verd. Lösungen nach dem Frieren bei allen Temperaturen ein Ansteigen der Leitfähigkeit, konzentriertere Lösungen ein Sinken der Leitfähigkeit mit Ausnahme von Eialbumin, verglichen mit der Leitfähigkeit der ungefrorenen Lösungen, aufweisen. Nur eine scheinbare Ausnahme ist bei der Betrachtung der Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessungen an 2-proz. Eialbumin-Lösungen nach Einwirkung des Frostes bzw. an mit gefroren gewesenem Eialbumin hergestellten Emulsionen zu beobachten. Sie erklärt sich aber zwanglos angesichts unserer auf S. 1150 gemachten Ausführungen. Diesen entsprechend haben wir es in dieser Konzentration vorwiegend mit einer wahrscheinlich bis zur Koagulation fortschreitenden Aggre-

<sup>39a)</sup> Gelatine-Lösungen geringerer Konzentration waren mit unserer Apparatur nicht zu messen.

gation zu tun. Die gestiegene Leitfähigkeit ergibt sich dann hauptsächlich aus der disaggregierten Teilchen.

Tabelle 14.

Kataphoretische Wanderungs-Geschwindigkeit  
gefrorener und ungefrorener Eialbumin- und Gelatine-Lösungen bei 19°.

Lösung	Einflußzeit in Min.	Meßdauer in Min.	Wanderung in mm
Eialbumin 1-proz. ungefroren ..	75	145	3.2 kathod.
Eialbumin 1-proz. 4 Stdn. bei — 18° gefroren .....	90	145	6.9 kathod.
Eialbumin 0.2-proz. ungefroren ..	80	150	1.8 kathod.
Eialbumin 0.2-proz. 4 Stdn. bei — 18° gefroren .....	80	128	3.0 kathod.
Gelatine 0.5-proz. ungefroren ..	120	115	4.8 kathod.
Gelatine 0.5-proz. 4 Stdn. bei — 18° gefroren .....	90	100	6.0 kathod.

Bei Betrachtung der in der Tabelle 14 wiedergegebenen Meßwerte ergibt sich, daß die kataphoretische Wanderungs-Geschwindigkeit der Teilchen der gemessenen lyophil-kolloiden Lösungen nach dem Frieren ungefähr auf das Doppelte gestiegen ist. Die kataphoretische Wanderungs-Geschwindigkeit der Gelatine-Lösungen ist absolut größer als die der Eialbumin-Lösungen.

## 6. Erörterungen.

Die hier mitgeteilten Befunde stehen in vollem Einklang mit den bekannten Untersuchungs-Ergebnissen von Mc Bain und seinen Mitarbeitern<sup>40)</sup>, laut welchen die starke Leitfähigkeit von Seifen-Lösungen sich umgekehrt zu den Veränderungen der Konzentrationen und der Temperatur verhält. An Stelle der gewöhnlichen Fettsäure-Anionen treten nämlich als Micellen rasch wandernde Anionen auf, insbesondere bei den höheren und bei größeren Konzentrationen. Aber auch in der konz. Lösung bildet lediglich der auf die Kolloide entfallende Anteil der Leitfähigkeit den größeren Teil der Gesamtleitfähigkeit. Eine gute Bestätigung der Annahme von der disaggregierenden und somit oberflächen-vergrößernden Wirkung des Frostes liegt schließlich in der Tatsache, daß die Leitfähigkeit der verdünnteren Lösungen stark zugenommen hat. Wir wissen ja aus den Untersuchungen von Nordenson<sup>41)</sup>, daß die Leitfähigkeit von dispersen Systemen, die die gleiche Stoffmenge in verschiedener disperser Verteilung enthalten, sich umgekehrt verhalten wie die Quadrate der Teilchenradien. Die Leitfähigkeit selbst röhrt von den höchst dispersen Teilen des Kolloids her. Die von uns erhaltenen Meßergebnisse bei Protein- und Gummi-arabicum-Lösungen stehen in Einklang mit den an Seifen-Lösungen erhaltenen Befunden.

Schließlich könnte unsere Auffassung von der Vergrößerung der Oberfläche der Kolloidteilchen als erhärtet angesehen werden durch die Ergebnisse der Messungen der kataphoretischen Wanderungs-Geschwindigkeit. Es kann angenommen werden, daß infolge der Verteilung der Partikelchen Elektrolyte aus den Proteinen in Lösung gegangen sind. Dadurch fand eine elek-

<sup>40)</sup> vergl. z. B. J. W. Mc Bain, M. E. Laing u. A. F. Titley, Journ. chem. Soc. London 115, 1279 [1919]. <sup>41)</sup> H. Nordenson, Kolloid-Ztschr. 16, 65 [1915].

trische Aufladung der Teilchen statt, die die Erhöhung der kataphoretischen Wanderungs-Geschwindigkeit zur Folge hat.

### 7. Mathematische Auswertung.

Im folgenden wurde noch der Versuch unternommen, die Anwendbarkeit der Gleichungen von v. Smoluchowski<sup>42)</sup> bzw. Einstein<sup>43)</sup> bei unseren theoretischen Überlegungen auf Grund einiger Versuchsdaten zu prüfen.

Die Viscosität wird in der Gleichung von v. Smoluchowski, wie folgt, ausgedrückt:

$$\eta_s = \eta_M \left\{ 1 + K \varphi \left[ 1 + \frac{1}{\lambda \eta_M r^2} \left( \frac{D \zeta}{2 \pi} \right)^2 \right] \right\}$$

Hier bedeuten  $\eta_s$  = die Viscosität der kolloiden Lösung,  $\eta_M$  = die der reinen Flüssigkeit,  $\varphi$  = das Volumen der Teilchen in der Volumeneinheit der kolloiden Lösung,  $\lambda$  = die spezif. Leitfähigkeit,  $r$  = den Radius der Teilchen,  $D$  = die Dielektrizitätskonstante,  $\zeta$  = den elektrokinetischen Potentialsprung,  $K$  = eine Konstante.

Mit Ausnahme der Größe der Teilchen-Radien können sämtliche, für die Auswertung der Gleichung erforderlichen Daten aus der hiesigen Untersuchung entnommen werden. Der Radius des Eiweißmoleküls 2.18 ist der Arbeit von Svedberg und Sjögren<sup>44)</sup> entnommen. Dagegen wurde der Radius der Gelatine-Teilchen mit Hilfe der Angaben von Krishnamurti und Svedberg<sup>45)</sup> auf Grund eines spezif. Volumens = 0.682 und des für die hiesigen Berechnungen ungünstigsten Molekulargewichts = 10000 ermittelt. Auf dieser Grundlage ergibt sich der Wert von 1.4 für den Radius des Gelatine-Moleküls. Da der Angabe für die kataphoretische Wanderungs-Geschwindigkeit der Eialbumin-Teilchen Messungen an einer 0.1-proz. Lösung zugrunde gelegt sind, konnte um so eher vorausgesetzt werden, daß sie mit der kataphoretischen Wanderungs-Geschwindigkeit einer 0.5-proz. Lösung übereinstimmt. Es wurde auch angenommen, daß kein Unterschied bei der kataphoretischen Wanderungs-Geschwindigkeit bei 19° und 22° besteht. Nach der von Hrn. Dr. H. B. Bull<sup>46)</sup> vorgenommenen Umwandlung unserer Daten in die erforderlichen Einheiten ergibt sich, daß der die elektrischen Veränderungen betreffende Teil der Gleichung:

$$\frac{1}{\lambda \eta_M r^2} \left( \frac{D \zeta}{2 \pi} \right)^2$$

im Falle des Eialbumins =  $2.15 \times 10^{-3}$  und im Falle der Gelatine  $5.45 \times 10^{-3}$  beträgt. Beide Zahlen sind wesentlich kleiner als 1 und können daher vernachlässigt werden, wodurch lediglich der von Einstein begründete Teil der Gleichung:

$$\eta_s = \eta_M [1 + K \varphi]$$

zur Geltung kommt. Obwohl diese Gleichung nicht immer geeignet ist, quantitative Aussagen zu ermöglichen, ist sie ohne weiteres für die Unterstützung qualitativer Zwecke verwendbar. Im Sinne der Einsteinschen Gleichung bedeuten daher unsere Befunde, daß im Falle des Eialbumins eine Vergrößerung des Gesamtvolumens der suspendierten Teilchen und im Falle

<sup>42)</sup> M. v. Smoluchowski, Kolloid-Ztschr. 18, 194 [1916].

<sup>43)</sup> A. Einstein, Ann. Physik [4] 19, 289 [1906]. <sup>44)</sup> I. c.

<sup>45)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. 52, 2897 [1930].

<sup>46)</sup> Ztschr. physikal. Chem. (A) 161 [1932], im Druck.

der Gelatine eine Verringerung unter Einwirkung desselben physikalischen Einflusses eingetreten ist. Beide Befunde erhärten die Auffassung, daß infolge der Frostwirkung beim Eialbumin eine irreversible Vergrößerung der Oberfläche der Teilchen unter Vermehrung des „gebundenen“ Wassers eintritt, und falls bei der Gelatine eine Disaggregation-Aggregation der Teilchen stattfindet, hier das Verhältnis zugunsten der letzteren verschoben ist.

### 8. Zusammenfassung.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Beobachtung, daß eine lyophil-kolloide Zymase-Lösung, nachdem sie der Frostwirkung ausgesetzt und wieder aufgetaut war, unter sonst gleichgebliebenen Versuchs-Bedingungen eine vorübergehend erhöhte Wirksamkeit zu entfalten vermag. Es wurde aus der nur vorübergehend erhöhten Wirksamkeit der Schluß gezogen, daß unter der Einwirkung des Frostes eine Vergrößerung der Oberfläche eintritt, die wiederum eine Steigerung der Empfindlichkeit gegen intermediäre Vorgänge bzw. Reaktionsprodukte nach sich zieht. Nachdem wir noch vorher den Nachweis erbracht und als allgemein gültig angesprochen haben, daß gasförmige und andere Verbindungen die Steigerung der enzymatischen Tätigkeit in verschiedenen Zellsystemen durch Erhöhung der Zellpermeabilität bewirken, haben wir nachher experimentell belegt, daß dieselben Verbindungen durch lyophil-kolloide Teilchen verzehrt werden und somit eine Protektor-Wirkung ausüben können. Hieraus ergibt sich mit Gewißheit, daß unsere Adsorptive in biologisch wichtigen Reaktionen eine zweifache Rolle zu spielen vermögen.

In der gegenwärtigen Untersuchung konnte dann mit Hilfe der Kryolyse und nachfolgender Messung der Oberflächenspannung, Tropfenzahl, Viscosität, elektrischen Leitfähigkeit bzw. kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Nachweis erbracht werden, daß die lyophilen Kolloide unter dem Einfluß des Frostes sowohl in Lösungen als auch bei Emulsionen eine irreversible physikalische Veränderung erleiden. In sämtlichen, im verdünnten Bereich vorgenommenen Messungen, die Viscositäts-Bestimmungen ausgenommen, war bei allen Kolloiden die Richtung der Veränderung gleichsinnig, — eine übereinstimmende, wenn auch nicht gleichsinnige Veränderung bei sämtlichen Messungen an den konzentrierten Lösungen bzw. Emulsionen konnte nur im Falle des Eialbumins beobachtet werden. Die Beständigkeit der mit gefroren gewesenen Emulgatoren hergestellten Emulsionen zeigte eine leichte Steigerung gegenüber Emulsionen, die mit ungefrorenen Emulgatoren hergestellt waren.

Da Eiweiß nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse nicht nur als Substanz für krystallisierte Enzyme in Frage kommt, sondern auch für die Eigenschaften der sogenannten Trägersubstanzen verantwortlich ist, so können diese Befunde als weiterer exakter Beweis der Abhängigkeit der Funktionen eines kolloiden Trägers von seinem physikalischen Zustand, z. B. dem Dispersitätsgrad, angesehen werden.

Die Untersuchung erfreute sich der dankenswerten Förderung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.