

### 73. Strömungsoptische und viskosimetrische Untersuchungen über den Lösungszustand von Casein II<sup>1)</sup>

von Hs. Nitschmann und H. Guggisberg.

(29. III. 41.)

#### 1. Der Einfluss von Neutralsalz auf die Strömungsdoppelbrechung und die Viskosität von Natriumcaseinatlösungen.

#### C. Messungen an Natriumcaseinatlösungen anderer Konzentration.

Die Versuche, über die in diesem Abschnitt zu berichten ist, hatten vor allem den Zweck, über die Konzentrationsabhängigkeit des elektroviskosen Effektes Auskunft zu geben. Sodann interessierte uns die Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität selber, da Schlüsse auf die Teilchenform nur aus der auf die Konzentration  $\rightarrow 0$  interpolierten Viskosität gezogen werden können.

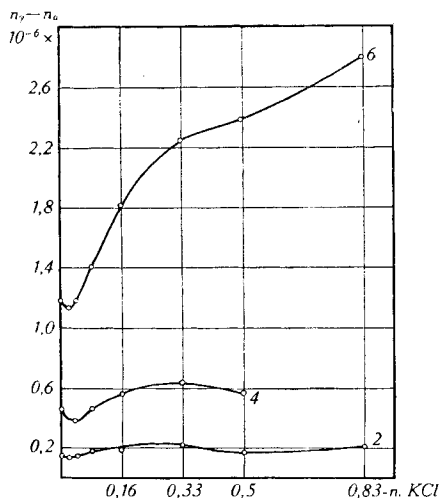


Fig. 10.

Strömungsdoppelbrechung für  $G = 4680$  bei 2-, 4- und 6-proz. Natriumcaseinatlösung in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration.

Wir untersuchten zuerst den Einfluss verschiedener Mengen von Kaliumchlorid auf die Strömungsdoppelbrechung und auf die Viskosität von 2- und 6-proz. Natriumcaseinatlösung ( $p_H = 7,5$ ). Kaliumchlorid war gewählt worden, weil es Effekt C am deutlichsten zeigt und es uns interessierte, ob derselbe bei anderen Caseinkonzentrationen auch anzutreffen sei. Da diese Versuche mit einer neuen

<sup>1)</sup> I. Teil, siehe Helv. **24**, 434 (1941).

Portion *Merck'schem* Casein durchgeführt werden mussten, stellten wir auch nochmals eine 4-proz. Lösung her, da wir Grund hatten, anzunehmen, dass dieses neue Casein mit dem früheren in seinem kolloidchemischen Verhalten nicht ganz identisch sei.

Aus Fig. 10 geht hervor, dass das Maximum von Effekt C nach etwas höheren Salzkonzentrationen verschoben ist (vgl. mit Fig. 2). Worauf diese Tatsache zurückzuführen ist, können wir nicht sagen. Sie zeigt nur, dass das Casein ein recht labiles und in seinen Eigenschaften nicht sehr konstantes Protein ist. Andererseits ist festzustellen, dass der Kurvenverlauf bei den drei an Casein verschiedenen konzentrierten Lösungen sehr ähnlich ist; bei allen lassen sich deutlich die drei verschiedenen Effekte feststellen.

Tab. 4 enthält die Viskositäten dieser Lösungen.

Fig. 11 gibt in graphischer Darstellung die Abhängigkeit der spezifischen Viskosität von der Salzkonzentration. Der merkwürdige Buckel oder Knick, den die Kurve *a* der 6-proz. Lösung bei 0,33-n. KCl aufweist, veranlasste uns, später mit einer neuen 6-proz. Lösung die Kaliumchlorid-Konzentrationsreihe nochmals durchzuviskosimetrieren. Der Knick wurde nicht mehr gefunden, wie Kurve *b* und die Werte in Tab. 11 zeigen.

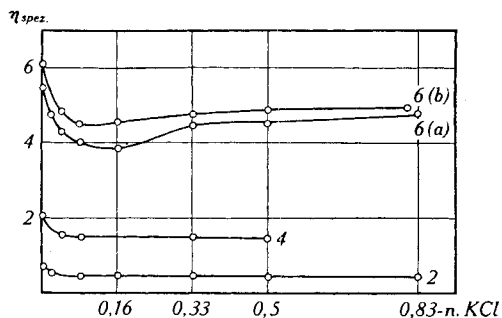


Fig. 11.

Spez. Viskosität von 2-, 4- und 6-proz. Natriumcaseinatlösungen in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration.

Untersucht man die spezifische Viskosität irgend einer Lösung bei verschiedenen Konzentrationen, so findet man allgemein, dass die Viskosität stärker als proportional mit der Konzentration ansteigt. Nur bei kleinen Konzentrationen findet man annähernd Proportionalität. *H. Staudinger* bezeichnet diejenige Konzentration, bis zu welcher die Proportionalität erfüllt ist, als Grenzkonzentration. Sie hat umso kleinere Werte, je stärker die Kolloidteilchen von der Kugelform abweichen. Man muss sich aber bewusst sein, dass es sich dabei nicht um eine scharfe Grenze handelt. Der stärkere Viskositätsanstieg ist bekanntlich darauf zurückzuführen, dass mit stei-

gender Konzentration die Teilchen sich in ihrer Beweglichkeit gegenseitig immer mehr behindern.

**Tabelle 4.**

Viskositäten bei variabler Casein- und Kaliumchlorid-Konzentration.

Caseinkonz. %	Salzkonz. (n.)	$\eta_{\text{spez.}}$ bez. auf caseinfreie Salzlösung	$\eta_{\text{spez.}}$ in % des Wertes für die salzfreie Lösung
2	0,0	0,662	100
	0,01	0,546	82,5
	0,04	0,488	74,1
	0,08	0,458	69,2
	0,16	0,434	65,5
	0,33	0,445	67,2
	0,5	0,427	64,6
	0,83	0,418	63,2
4	0,0	2,078	100
	0,04	1,512	72,9
	0,08	1,482	71,5
	0,16	1,427	68,9
	0,33	1,452	70,3
	0,5	1,463	70,6
6 (a)	0,0	5,509	100
	0,01	4,752	86,4
	0,04	4,283	77,8
	0,08	4,091	74,4
	0,16	3,854	70,0
	0,33	4,404	80,0
	0,5	4,529	82,2
	0,83	4,796	87,1
6 (b)	0,0	6,10	100
	0,04	4,68	79,7
	0,08	4,52	74,0
	0,16	4,545	74,3
	0,32	4,73	77,6
	0,5	4,87	79,9
	0,8	4,97	81,5

Fig. 12 gibt die Konzentrationsabhängigkeit der spez. Viskosität von salzfreier Natriumcaseinatlösung (a) und solcher mit 0,08-n. KCl (b) wieder<sup>1)</sup>.

Es sind von verschiedenen Forschern eine ganze Reihe von Formeln in Vorschlag gebracht worden, um die Konzentrationsab-

<sup>1)</sup> Diese Konzentration wird hier für die Betrachtung gewählt, weil sie gerade genügt, um den elektroviskosen Effekt auszuschalten.

hängigkeit der Viskosität zu beschreiben. Je nach dem System, das man untersucht, erfüllt diese oder jene ihren Zweck besser.

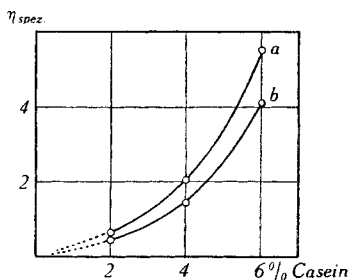


Fig. 12.

Viskosität in Abhängigkeit von der Caseinkonzentration.

Eine wegen ihrer Einfachheit oft angewandte Formel ist diejenige von *Arrhenius*<sup>1)</sup>:

$$\eta/\eta_0 = \alpha^n$$

$\eta$  = Viskosität der Lösung  
 $\eta_0$  = Viskosität des Lösungsmittels  
 $\alpha$  = Konstante  
 $n$  = Konzentration

*Loeb* hat gezeigt, dass sie z. B. bei Gelatine die Verhältnisse gut wiedergibt<sup>2)</sup>. Bei unsern Caseinatlösungen ist die Konstanz von  $\alpha$  für variable Konzentrationen nicht sehr gut, wie aus Tab. 5 hervorgeht.

Tabelle 5.

Konz. ‰	$\alpha$ für:	
	Natrium-caseinat ohne Salz	Natrium-caseinat mit 0,08-n. KCl
0	1,25*)	1,16*)
2	1,29	1,207
4	1,325	1,249
6	1,366	1,326

\*) interpoliert.

Der Anstieg der Viskosität mit der Konzentration ist also noch etwas steiler als der Gleichung von *Arrhenius* entspricht.  $\alpha$  lässt sich graphisch sehr leicht auf die Konzentration = 0 interpolieren und ist dann ein gutes Mass, um die spezifischen Viskositäten von Caseinlösungen in verschiedenen Lösungsmitteln miteinander zu vergleichen, da bei  $n \rightarrow 0$  eine gegenseitige Beeinflussung der Teilchen natürlich nicht mehr stattfindet.

<sup>1)</sup> Z. physikal. Ch. **1**, 258 (1887).

<sup>2)</sup> *Loeb*, Die Eiweisskörper, 1924.

# a) Beziehungen zwischen Viskosität und Teilchengestalt.

Bei kolloiden Lösungen mit kugeligen Teilchen sollte die spezifische Viskosität proportional dem von der dispersen Phase eingenommenen Volumen zu- resp. abnehmen. Diese Beziehung ist bekanntlich zuerst von *Einstein* für starr-elastische Kugeln, welche beträchtlich grösser als die Lösungsmittelmolekeln sein sollen, theoretisch abgeleitet worden. Der Proportionalitätsfaktor beträgt nach ihm 2,5, also:

$$\eta/\eta_0 - 1 = 2,5 \cdot G \quad | \quad G = \text{Volumen der dispersen Phase in der Volumeneinheit der Lösung.}$$

Die Gleichung kann natürlich nur unterhalb der Grenzkonzentration erfüllt sein. Der Zahlenfaktor ist nicht ganz sicher. Immerhin konnte er für einige Kolloidsysteme bei Interpolation der Viskosität auf die Konzentration = 0 experimentell bestätigt werden; siehe *H. Freundlich*: Kapillarchemie 1932, II, S. 9. *Polson*<sup>1)</sup> gibt dagegen den empirisch ermittelten Wert 4 an.

*Breede*<sup>2)</sup> schreibt das *Einstein*'sche Gesetz wie folgt:

$$\eta_{\text{spez.}} = 2,5 \cdot V_0 \cdot G \quad | \quad \eta_{\text{spez.}} = \eta/\eta_0 - 1$$

und bezeichnet  $V_0$  als die Voluminosität; es ist das Verhältnis des scheinbaren Viskositätsvolumens, womit sich die Teilchen in Lösung hydrodynamisch geltend machen, zu ihrem Trockenvolumen.

Bei den Lösungen der meisten organischen Kolloide, insbesondere bei den Proteinen findet man Voluminositäten, welche beträchtlich über 1 liegen. Hiefür kommen, wenn man den *Einstein*'schen Faktor 2,5 als an und für sich richtig ansieht, vor allem drei Gründe in Betracht:

1. Der elektroviskose Effekt nach *v. Smoluchowsky*.
2. Das hydrodynamisch wirksame Volumen der Teilchen ist grösser als ihr Trockenvolumen wegen Solvation, Quellung oder Spreizung.
3. Die Teilchen haben nicht Kugelgestalt. Jede Abweichung von dieser Form bedingt eine erhöhte Viskosität. Bei Fadenmolekeln z. B. steigt  $V_0$  mit ihrer Länge sehr stark an.

Während man den elektroviskosen Effekt durch Zusatz von Neutralsalz ausschalten kann, gelingt es nicht, die unter 2. und 3. genannten Faktoren sicher auseinander zu halten. Es fehlt leider an Methoden, welche das hydrodynamisch wirksame Volumen der Teilchen zu bestimmen gestatten. Man ist vorläufig auf Schätzungen angewiesen, welche gerade bei den Proteinen keine sehr grosse Genauigkeit beanspruchen können. Einzig dort, wo stärkere Abweichungen von der Kugelform ausgeschlossen sind, lässt sich aus der Viskosität direkt auf die Raumerfüllung schliessen. Dennoch kann man heute mit grosser Gewissheit behaupten, dass die

<sup>1)</sup> Koll. Z. **88**, 51 (1939).

<sup>2)</sup> Chem. Weekbl. **30**, 223 (1933).

hohen Viskositäten bei den Proteinen zur Hauptsache auf gestreckte Form der Teilchen und nur zum kleineren Teil auf Hydratation und Quellung zurückzuführen sind. Dafür können verschiedene Tatsachen ins Feld geführt werden:

1. Die bisher untersuchten Proteine mit grösseren Voluminositäten zeigen alle den Effekt der Strömungsdoppelbrechung. Nicht gefunden werden konnte er z. B. beim Ovalbumin (*Boehm* und *Signer*<sup>1)</sup>), welches auch nur die für Proteine ausnehmend kleine Voluminosität von 2,5 besitzt. Seine Teilchen sind wohl schon zu wenig lang, um merkliche Orientierung zu ergeben.

*Küntzel* und *Doehner*<sup>2)</sup> wenden sich gegen unsere Auffassung, dass das Auftreten von Strömungsdoppelbrechung in den Alkalicaseinatlösungen auf die Orientierung länglicher Teilchen zurückzuführen sei. Für organische Makromolekeln lehnen sie die Orientierungsdoppelbrechung scheinbar überhaupt ab und greifen eine vor mehreren Jahren von *W. Haller*<sup>3)</sup> und *W. Kuhn*<sup>4)5)</sup> aufgestellte Theorie auf. Nach dieser soll die Strömungsdoppelbrechung bei organischen hochmolekularen Kolloiden durch die Deformation bedingt sein, welche die lockere Knäuel bildenden Molekeln oder Molekelaggregate unter der Wirkung der Scherkräfte erleiden.

Es kann hier nicht im einzelnen auf die Theorie der Strömungsdoppelbrechung eingegangen werden. Doch ist darauf hinzuweisen, dass die seither erfolgte Weiterbearbeitung des Problems, an welcher *Ch. Sadron* den Hauptanteil gehabt hat, kaum einen Zweifel darüber zulässt, dass der Effekt im wesentlichen durch die Orientierung anisodimensionaler und optisch anisotroper Teilchen bedingt ist. Eine experimentelle Bestätigung der theoretischen Ansätze von *Sadron* liegt in jüngsten Untersuchungen von *R. Signer* und Mitarbeitern vor. Sie haben besonders an fraktionierter Methylcellulose gezeigt, dass die aus strömungsoptischen Daten mit den neueren Formeln berechneten Teilchendimensionen mit den aus Viskositäts- und Sedimentationsmessungen ermittelten gut übereinstimmen (vgl. *A. Wissler*<sup>6)</sup>).

Als direkten Beweis dafür, dass die Strömungsdoppelbrechung bei Caseinlösungen nicht in der stäbchenförmigen Beschaffenheit der Teilchen ihren Grund haben kann, führen *Küntzel* und *Doehner* folgenden Umstand an:

Die Caseinteilchen in der Milch müssen annähernd rund sein, da verdünnte Milch nicht nur keine Strömungsdoppelbrechung, sondern auch keinen *Gans*-Effekt zeigt. Setzt man Natronlauge zur Magermilch, so findet starke Aufhellung begleitet von einem Viskositätsanstieg statt. Die alkalische Milch zeigt jetzt Strömungs-

<sup>1)</sup> Helv. **14**, 1370 (1931).

<sup>2)</sup> Koll.-ch. Beih. **51**, 277 (1931).

<sup>3)</sup> Koll. Z. **61**, 26 (1932).

<sup>4)</sup> Z. physikal. Ch. [A] **161**, 427 (1932).

<sup>5)</sup> Koll. Z. **62**, 269 (1932).

<sup>6)</sup> Diss. Bern 1940.

doppelbrechung, und zwar in ungefähr gleicher Stärke wie eine an Casein gleich konzentrierte Natriumcaseinatlösung. Analoge Erscheinungen erhält man, wenn man die Milch in geeignetem Verhältnis mit Säure versetzt. Wegen des Viskositätsanstieges interpretieren *Küntzel* und *Dochner* diese Veränderungen als Quellung. Da kein Grund zur Annahme einer Anisotropie der Quellung vorliegt, glauben sie, dass auch in der alkalischen resp. sauren Milch runde Teilchen vorliegen.

Diese Argumentation ist jedoch nicht stichhaltig, da die Phänomene viel weniger durch Quellung als durch eine sehr weitgehende Dispergierung der grossen Calciumcaseinateilchen bedingt sind. Die beiden Autoren rechnen übrigens selbst auch mit einer solchen, wie folgender Passus auf S. 302 ihrer Arbeit zeigt:

„Die starke Viskositätserhöhung unter Einfluss des Alkalizusatzes konnte unmittelbar als Ausdruck für die Volumenvermehrung der Kaseinteilchen durch Quellung aufgefasst werden. Damit würde man aber den wahren Verhältnissen nicht gerecht werden, denn es findet offenbar im Laufe der Quellung ein allmähliches Übergehen in eine echte Lösung statt, so dass nach Einstellung des Quellungsgleichgewichtes die Kaseinlösung nicht mehr eine mizell-kolloide Struktur, sondern eine molekül-kolloide Struktur im Sinne von *Staudinger* besitzt.“

Es verwundert deshalb, dass die Autoren das Auftreten der Strömungsdoppelbrechung dennoch dadurch zu erklären versuchen, dass die runden Kaseinteilchen unter Formerhaltung quellen und erst in diesem Zustand weich genug sein sollen, um merklich Deformierungs- oder Spannungsdoppelbrechung zu zeigen.

*W. Lotmar*, der die Frage des Zusammenhanges zwischen Depolarisationsgrad und Teilcheneigenschaften bei der Lichtstreuung der Kolloide eingehend bearbeitet hat <sup>1)2)</sup>, hat neuerdings mit *Hs. Nitschmann*<sup>3)</sup> auch das Streulicht von neutraler und von alkalischer Magermilch untersucht. Diese Messungen haben ergeben, dass die bei Zusatz von Natronlauge beobachtete Aufhellung der Milch nicht durch Quellung, sondern zur Hauptsache durch eine sehr weitgehende Dispergierung der Teilchen erklärt werden muss. Das in der Milch suspendierte Calciumcaseinat bildet wahrscheinlich rundliche, optisch isotrope Klümpchen, deren Grösse in weiten Grenzen variiert (*Svedberg*<sup>4)</sup>). Erst ihre Dispergierung ermöglicht Strömungsdoppelbrechung, weil die dispergierten Teilchen länglich und optisch anisotrop sind. Die Zusammenlagerung des Calciumcaseinates zu den sehr grossen Teilchen in der Milch ist nicht ohne weiteres mit den Aggregationsvorgängen zu vergleichen, welche sich bei Zusatz gewisser Salze (z. B. Natriumsulfat) in Alcalicaseinatlösungen abspielen (Effekt B), da im letzteren Falle die Aggregate wie die Primärteilchen länglich sind, im ersteren Falle aber nicht. Die Salze bewirken

<sup>1)</sup> Helv. **21**, 792 (1938).

<sup>2)</sup> Helv. **21**, 953 (1938).

<sup>3)</sup> Helv. **24**, 242 (1941).

<sup>4)</sup> Koll. Z. **51**, 10 (1930).

eben Parallelaggregation; in den sehr viel grösseren Teilchen der Milch dagegen nehmen die länglichen Primärteilchen in statistischer Verteilung alle möglichen Lagen ein. Nur so ist es nämlich möglich, dass aus optisch anisotropen Teilchen isotrope Aggregate entstehen (vgl. *Lotmar*<sup>1)</sup>, S. 977). Es sei noch bemerkt, dass sich am Aufbau dieser Milchcaseinklümpchen auch kleinere Parallelaggregate beteiligen können; es ist dies sogar sehr wahrscheinlich.

2. Für eine gestreckte Form der Proteinmolekeln sprechen vor allem auch die Ergebnisse der Auswertung der Dissymmetriefaktoren von Proteinen und ihren Dissoziationsprodukten, wie sie von *A. Polson*<sup>2)</sup> und *H. Neurath*<sup>3)</sup> vorgenommen worden ist. Die beiden Autoren sind schon früher zitiert worden; es muss aber hier nochmals etwas näher auf ihre Arbeiten eingegangen werden.

Als Dissymmetriefaktor bezeichnet man nach *Svedberg* das Verhältnis  $f/f_0$ , wobei  $f$  die durch Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung in der Ultrazentrifuge ermittelte Reibungskonstante des Teilchens bedeutet.  $f_0$  ist die rechnerisch ermittelte Reibungskonstante, welche ein kugeliges Teilchen von gleichem Gewicht hätte. Dieses Gewicht muss also bekannt sein. Auch aus der Diffusionsgeschwindigkeit lässt sich der Dissymmetriefaktor ermitteln, da

$$f/f_0 = D_0/D$$

$D$  = gemessene Diffusionskonstante,

$D_0$  = Diffusionskonstante berechnet für kugelige Teilchen von gleichem Gewicht.

$f/f_0$  wird nur dann gleich 1, wenn die Teilchen rund und überhaupt nicht solvatisiert sind. Dieselben Faktoren, welche  $V_0$  über 1 erhöhen, tun dies auch bei  $f/f_0$ . *Herzog*, *Illig* und *Kudar*<sup>4)</sup> und *Perrin*<sup>5)</sup> haben für Rotationsellipsoide Formeln abgeleitet, welche  $f/f_0$  als Funktion des Achsenverhältnisses darstellen. *Polson* und *Neurath* haben mit ihrer Hilfe die Achsenverhältnisse für eine ganze Reihe von Proteinen ermittelt. Interessant ist nun schon die Tatsache, dass Dissoziationen, wie sie unter der Wirkung von  $p_H$ -Verschiebungen vor sich gehen, stets eine beträchtliche Änderung des Dissymmetriefaktors mit sich bringen. Als Beispiel sei erwähnt Haemocyanin von *Helix pomatia*, dessen Molgewicht beim Übergang von  $p_H$  6,6 zu 8,6 auf ca.  $\frac{1}{8}$  sinkt, wobei  $f/f_0$  von 1,24 auf 1,88 steigt. Bei kugelförmigen Teilchen kann man sich kaum vorstellen, wie nach der Dissoziation eine dementsprechend grössere Raumbeanspruchung zustande kommen sollte. Dagegen finden alle diese Änderungen des Dissymmetriefaktors eine zwanglose Deutung, wenn man aus  $f/f_0$  und dem Molekulargewicht die absoluten Dimensionen der als Rotationsellipsoide angenommenen Teilchen berechnet.

<sup>1)</sup> *Helv.* **21**, 953 (1938).

<sup>2)</sup> *Koll. Z.* **88**, 51 (1939).

<sup>3)</sup> *Am. Soc.* **61**, 1841 (1939).

<sup>4)</sup> *Z. physikal. Ch. [A]* **167**, 330 (1933).

<sup>5)</sup> *J. Physique Radium* **7**, 1 (1936).



Es zeigt sich dann, dass die Länge der einen Achse innerhalb der Fehlergrenze gleich bleibt, die Spaltung also längs dieser Achse verläuft. Da es sich um eine ganze Reihe von Beispielen handelt, ist es nicht möglich, dass dieser Mechanismus nur zufällig vorgetäuscht wird. Die Voraussetzungen, unter denen diese Rechnungen durchgeführt wurden — ellipsoidische Teilchen und gegenüber dem Formeinfluss zu vernachlässigende Solvation —, scheinen also ziemlich gut zuzutreffen. Mindestens muss man *Polson* zustimmen, wenn er schreibt, dass es sich trotz der Schwierigkeiten, die sich der Annahme einer definierten Gestalt der Proteinpartikel entgegenstellen, als vorteilhaft erwiesen hat, sie sich als langgezogene Rotationsellipsoide vorzustellen.

3. Es liegen Messungen über die Hydratation der Proteine vor. Vor allem sind die Arbeiten von *H. H. Weber* und Mitarbeitern zu erwähnen<sup>1)2)</sup>, welche das Hydratationsvolumen durch Bestimmung des nicht lösenden Raumes in Eiweisslösungen ermittelt haben. Dasselbe beträgt, wie schon weiter vorne angegeben wurde, für 1 g Serumalbumin 1 cm<sup>3</sup>, für 1 g Seroglobulin 1,3 cm<sup>3</sup>. Beachtenswert sind in diesem Zusammenhange auch die Untersuchungen von *G. S. Adair* und *M. E. Adair*<sup>3)</sup> über die Dichte und Zusammensetzung von Proteinkristallen in wässrigen Medien. Diese Dichten sind beträchtlich niedriger als die der getrockneten Proteine, weil die Krystalle stets Wasser enthalten. Der Wassergehalt liegt zwischen 0,2 und 0,34 g pro 1 g trockenes Protein. Dieses Verhältnis ist auffallend ähnlich dem von *Weber* gefundenen. Dieses Wasser dürfte nicht einmal alles fest gebundenes Krystallwasser sein, denn sonst wäre es schwer verständlich, dass, wie *Adair* und *Adair* berichten, anorganische Ionen frei durch die Krystalle diffundieren. Es ist nicht wahrscheinlich, dass die Wassermenge, welche über das festgebundene Hydratwasser hinaus in den Proteinkristallen enthalten ist, wesentlich diejenige Menge übersteigt, welche von den gelösten Proteinmolekeln wegen Quellung oder Spreizung mechanisch festgehalten wird. Jedenfalls spricht nichts zwingend dafür, dass das wirksame Viskositätsvolumen der gelösten Proteine viel über das 1,5- bis 2-fache ihres Trockenvolumens hinausgeht. Dass dem Quellungsvolumen in Lösung von manchen Autoren eine so riesige Bedeutung zugeschrieben wird, kommt wohl daher, dass weitaus die grösste Zahl der Untersuchungen an der Gelatine ausgeführt wurden. Die Gelatine ist aber ein Protein, dessen sicher ebenfalls langgestreckte Teilchen (vgl. *A. Wissler*<sup>4)</sup>) ausserordentlich zur Bildung lockerer Aggregate mit netzartiger Struktur neigen. Dass hierbei grosse Mengen von Wasser blockiert werden können, liegt auf

<sup>1)</sup> Bioch. Z. **204**, 215 (1929).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **234**, 62 (1931).

<sup>3)</sup> Proc. Roy. Soc. London [B] **120**, 422 (1936).

<sup>4)</sup> Diss. Bern 1940.

der Hand. Zu dieser Art von Pseudo-Eiweisslösungen gehört wahrscheinlich auch die native Milch, in der die rundlichen Calcium-caseinatpartikel ein Viskositätsvolumen  $V_0$  von 4,5 zeigen. Solche Systeme sind jedoch scharf zu unterscheiden von Lösungen, in denen die Proteine molekulardispers oder in kompakten Parallelaggregaten oder -assoziaten vorliegen.

Diese Ausführungen sollten zeigen, dass gegen die Annahme einer länglichen Form, welche die Caseinteilchen in Lösung mit den meisten anderen Proteinen gemeinsam hätten, triftige Gründe nicht vorliegen. Wir können deshalb unbedenklich an den Versuch gehen, aus unsern Viskositätsdaten die Achsenverhältnisse der Caseinteilchen zu berechnen. Dabei bleiben wir uns zweierlei bewusst:

1. Dass wir bei der Polydispersität des Systems nur Mittelwerte bekommen können;
2. dass die erhaltenen Grössen absolut betrachtet nur Näherungswerte sein können und ihre Bedeutung somit vor allem in der Möglichkeit des Vergleichs unter sich liegt.

Für die

#### Berechnung der Achsenverhältnisse der Teilchen

gelöster Proteine aus der Viskosität der Lösungen kommen vor allem zwei Formeln in Betracht; die eine stammt von *J. M. Burgers*<sup>1)</sup>, die andere von *A. Polson*<sup>2)</sup>. Die bekannte *Staudinger'sche* Viskositätsformel kommt hier nicht in Frage, da sie nur für offene, nicht aggregierte Fadenmolekeln gilt. Solche liegen hier wie in den meisten Proteinlösungen sicher nicht vor.

*Burgers* hat seine Formel von hydrodynamischen Ansätzen ausgehend für starre Rotationsellipsoide abgeleitet. Sie stellt eine Erweiterung der *Einstein'schen* Gleichung dar:

$$\eta_{\text{spez.}} = \eta/\eta_0 - 1 = G A$$

$A$  ist eine komplizierte Funktion des Achsenverhältnisses  $a/b$ . Für den Fall, dass die *Brown'sche* Bewegung stark ist, gibt *Burgers* eine Näherungsgleichung für diese Funktion. Am bequemsten ermittelt man die zu bestimmten  $A$  gehörigen  $a/b$ -Werte aus der in der *Burgers' Arbeit* abgebildeten Kurve.

Die Gleichung von *Polson* ist eine empirische Modifikation der von *W. Kuhn*<sup>3)4)</sup> ebenfalls für Sole ellipsoidischer Teilchen mit starker *Brown'scher* Bewegung abgeleiteten Formel:

$$\eta/\eta_0 = 1 + 2,5 G + G/16 (a/b)^2$$

Die Koeffizienten in dieser *Kuhn'schen* Gleichung wurden so abgeändert, dass sie für eine grössere Anzahl von Proteinlösungen

<sup>1)</sup> Secd. Report on Viscosity and Plasticity, 1938.

<sup>2)</sup> Koll. Z. **88**, 51 (1939).

<sup>3)</sup> Z. physikal. Ch. [A] **161**, 1 (1932).

<sup>4)</sup> Koll. Z. **62**, 269 (1932).

die beobachteten Viskositätsdaten ergaben, wenn die aus Sedimentations- und Diffusionsdaten ( $f/f_0$ ) erhaltenen Achsenverhältnisse in die Formel eingesetzt wurden. *Polson* hat nämlich für diese Proteine  $\eta_{\text{spez.}}/G$  gegen  $(a/b)^2$  aufgetragen. Aus der Tatsache, dass alle Punkte gut auf einer Geraden liegen, muss geschlossen werden, dass die Viskosität, wie die *Kuhn*'sche Formel verlangt, tatsächlich proportional  $(a/b)^2$  ansteigt. Aus den Konstanten der Geraden leitet *Polson* seine empirische Formel ab; sie lautet:

$$\eta/\eta_0 = 1 + 4,0 \cdot G + 0,098 \cdot G \cdot (a/b)^2$$

Hierin ist für  $\eta/\eta_0$  nach *Polson* wegen der Konzentrationsabhängigkeit nicht irgendein direkt gemessener Wert einzusetzen, sondern  $1 + \ln \alpha$ , wobei  $\alpha$  die Konstante in der *Arrhenius*'schen Beziehung (siehe vorne) bedeutet. Wenn  $\alpha$  für variable Konzentration nicht ganz konstant ist, wie das beim Casein der Fall ist (s. Tab. 5), wird man den auf die Konzentration = 0 interpolierten  $\alpha$ -Wert einsetzen.  $G$  bedeutet dann das vom Protein in 1 cm<sup>3</sup> einer 1-proz. Lösung eingenommene Volumen, d. h.  $G$  = spez. Partialvolumen/100.

# 1. Achsenverhältnisse der Teilchen in neutraler Natrium-caseinatlösung mit 0,08-n. KCl.

Dieses Beispiel wird gewählt, weil 0,08-n. KCl den elektroviseosen Effekt gerade aufhebt, aber den Dispersitätsgrad des Caseins jedenfalls noch nicht stark beeinflusst.

## Berechnung nach *Burgers*:

Wir berechnen das Beispiel für 0,1% Casein. Die relative Viskosität  $\eta/\eta_0$  ist hierfür nicht direkt gemessen, sondern aus  $\alpha_{n \rightarrow 0} = 1,16$  mit der *Arrhenius*'schen Gleichung  $\eta/\eta_0 = \alpha^n$  berechnet. Dann ist  $\eta/\eta_0 = 1,015$ . Ferner  $G = 0,0077^1$ .

Es wird  $A = 19,5$ ; daraus

$$a/b = 26$$

## Berechnung nach *Polson*:

Auch hier wird  $\alpha_{n \rightarrow 0} = 1,16$  eingesetzt und man bekommt

$$a/b = 12,45$$

Das nach *Burgers* berechnete Achsenverhältnis ist etwa doppelt so gross als das nach *Polson* berechnete. Es fragt sich, welchem Wert man den Vorzug geben soll.

Die *Burgers*'sche Formel ist, wie schon erwähnt, rein theoretisch abgeleitet worden. Praktisch bewährt hat sie sich bei der Berechnung der Achsenverhältnisse von Methylcellulosefraktionen<sup>2)3)</sup>. Die dort mit ihr ermittelten Werte stimmen befriedigend mit denjenigen überein, die für die gleichen Präparate aus Sedimentations-, Diffusions- und strömungsoptischen Daten gewonnen wurden.

<sup>1)</sup> Genaue Daten über das spezifische Partialvolumen des Caseins liegen nicht vor. Für unsere Zwecke ist aber auch keine grosse Genauigkeit erforderlich. Die Dichte wurde zu 1,3 (*Suttermeyer* und *Browne*, Casein and its industrial applications, 1939, S. 31) angenommen. <sup>2)</sup> *Svedberg* und *Pedersen*, Die Ultrazentrifuge, 1940.

<sup>3)</sup> *A. Wissler*, Diss. Bern 1940.

Bei der *Polson*'schen Formel muss man sich bewusst sein, dass sie empirisch für Proteine auf Grund der für eine ganze Reihe von Beispielen aus den Dissymmetriefaktoren  $f/f_0$  berechneten Achsenverhältnisse aufgestellt worden ist. Es kommt also darauf hinaus, dass die Auswertung der Viskositätsdaten nach *Polson* bei den Proteinen ungefähr dieselben Achsenverhältnisse ergibt, wie die Auswertung der Sedimentations- und Diffusionsdaten. Tabellen III und VIII in *Polson*'s Arbeit beweisen, dass dies bereits für zahlreiche Proteine feststeht. Es ist kein Grund vorhanden, anzunehmen, dass die Verhältnisse beim Casein wesentlich anders liegen sollten. Da die Anwendung der *Polson*'schen Gleichung bei Proteinen effektiv einer Bestimmung von  $a/b$  aus  $f/f_0$  gleichkommt, sei darauf hingewiesen, dass auch bei anderen organischen Kolloiden die aus Sedimentations- und Diffusionsdaten und die nach *Burgers* aus der Viskosität berechneten Achsenverhältnisse mehr oder weniger stark auseinandergehen. Einige Beispiele sind auf S. 392 der „Ultrazentrifuge“<sup>1)</sup> zusammengestellt. Dort wird auch auf den wahrscheinlichen Grund dieser Diskrepanz hingewiesen:

Bei beiden Methoden wird die Rechnung unter der Annahme durchgeführt, dass die Teilchen starre, gestreckte Rotationsellipsoide sind. Wie genau diese Annahme im einzelnen Falle zutrifft, ist schwer mit Sicherheit zu entscheiden. Wenn die Teilchen andere Gestalt haben, so darf nicht ohne weiteres angenommen werden, dass das wirksame (scheinbare) Achsenverhältnis für die Sedimentation dasselbe ist, wie für die Viskosität.

Die Frage, ob bei den Proteinen die nach *Burgers* aus der Viskosität berechneten Achsenverhältnisse der Wirklichkeit näher stehen als die aus  $f/f_0$  oder nach *Polson*'s Viskositätsgleichung erhaltenen, bleibt vorerst unentschieden. Eine Abklärung dieser Frage ist in erster Linie von exakten Untersuchungen der Strömungsdoppelbrechung bei monodispersen Proteinen, von denen die durch Sedimentation oder Diffusion bestimmten Molekulargewichte und Dissymmetriefaktoren vorliegen müssen, zu erwarten. Der Vergleich der aus Winkelmessungen bei kleinen Gradienten erhaltenen  $a/b$ -Werte mit den nach den anderen Methoden ermittelten dürfte von grösstem Interesse sein.

Nimmt man an, dass 1 g Casein ähnlich dem Serumglobulin ein Hydratationsvolumen von  $1,3 \text{ cm}^3$  besitzt, so reduziert sich das Achsenverhältnis folgendermassen:

$$\begin{array}{ll} \text{Nach Burgers} & a/b = 17,5 \\ \text{Nach Polson} & a/b = 8,7 \end{array}$$

#### Absolute Dimensionen der Caseinteilchen?

Es soll einmal der Wert 8,7 als richtig angenommen werden, um ein ungefähres Bild über die absoluten Dimensionen der Casein-

<sup>1)</sup> Svedberg und Pedersen, Die Ultrazentrifuge, 1940.

teilchen zu gewinnen. Ferner nehmen wir als Durchschnittsmolekulargewicht den Wert 120 000 an, was nach *Svedberg, Carpenter* und *Carpenter*<sup>1)</sup> der Grössenordnung nach zutreffen muss. Ein Teilchen enthält dann 1000 Aminosäurereste von einem mittleren Gewicht von 120. Als weitere Annahme setzen wir ein Hydratationsvolumen von 1,3 cm<sup>3</sup> für 1 g Casein, sowie kreiszylindrische Form der Teilchen. Die Rechnung ergibt dann für die Teilchen eine

Dicke von 33,4 Å

Länge von 290 Å

Dass hier keine Fadenmolekeln im Sinne *Staudinger's* vorliegen können, ergibt sich sofort aus folgender Überlegung. Aus röntgenographischen Untersuchungen von Naturseide (*Kratky und Kuryma*<sup>2)</sup>), in welcher Polypeptidketten parallel gelagert in gestreckter Form vorliegen, weiss man, dass eine Aminosäure sich an der Längsausdehnung der Faser mit 3,5 Å beteiligt. Eine gestreckte Kette von 1000 Aminosäuren hätte demnach eine Länge von 3500 Å. Unter den gleichen Voraussetzungen wie oben erhält man für diese Fadenmolekel eine Dicke von 10,1 Å<sup>3)</sup>.

Das Achsenverhältnis dieser Fadenmolekel betrüge:

$$a/b = 350$$

Würde man diese sehr lange und dünne Molekel in 12 gleiche Stücke zerschneiden und dieselben zu einem Bündel zusammenlegen, so bekäme man ungefähr diejenige Form, welche die Caseinteilchen wahrscheinlich im Mittel haben. Die Verhältnisse werden durch Fig. 13 veranschaulicht.

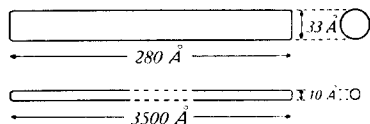


Fig. 13.

Oben: Wahrscheinliche Durchschnittsdimensionen der Caseinteilchen in neutraler Natriumcaseinatlösung. Unten: Dimensionen einer gestreckten Fadenmolekel von gleichem Molekulargewicht.

Es drängt sich die Frage auf, wie wohl die Peptidketten in diesen länglichen Molekeln oder Teilchen angeordnet sind. Sind sie irgendwie geknäuelte oder liegen die Ketten parallel der Längsachse? Sicheres lässt sich hierüber nicht sagen. Die Untersuchungen über die Änderungen der Teilchendimensionen bei Proteindissoziationen

<sup>1)</sup> Am. Soc. **52**, 241 (1930).

<sup>2)</sup> Z. physikal. Ch. [B] **11**, 363 (1931).

<sup>3)</sup> Für Seide, deren krystalliner Anteil aus Alanin und Glykokoll besteht, beträgt der seitliche Abstand der Peptidketten 4,5 bis 6,1 Å. Unter Spannung getrockneter Muskel gibt quer zur Faserrichtung eine Identitätsperiode von 10 Å (*Pauli-Valkó*, Kolloidchemie der Eiweisskörper, 1933, S. 136).

(*Polson, Neurath*) lassen es aber als äusserst wahrscheinlich erscheinen, dass die Ketten parallel liegen.

Das Problem der Molekelform spielt eine bedeutsame Rolle bei den Bemühungen, die heute allenthalben gemacht werden, um aus löslichen Eiweisstoffen künstliche Textilfasern herzustellen. Wie man heute weiss, besteht das Geheimnis der grossen Reissfestigkeit der natürlich gewachsenen Faserstoffe in der dichten Parallelpackung sehr langer Fadenmolekeln. Bei den künstlichen Fasern versucht man eine ähnliche Feinstruktur durch die verschiedenen Streckspinnverfahren zu erzeugen. Es ist klar, dass diese Bemühungen umso eher zu der gewünschten Reissfestigkeitserhöhung führen werden, je länger die Teilchen sind. Bei globularen Teilchen ist schliesslich überhaupt kein Streckungseffekt mehr zu erwarten. Die Tatsache, dass alle aus Casein bisher hergestellten Fasern nicht nur hinter Seide, Wolle und Baumwolle, sondern auch hinter guter Kunstseide in bezug auf die Reissfestigkeit stark zurückbleiben, ist wohl sicher darauf zurückzuführen, dass die Caseinteilchen verhältnismässig kurz sind und sich deshalb beim Streckspinnprozess nur mangelhaft in der Faserlängsrichtung orientieren. Die Cellulose einer erstklassigen Kunstseide der Steckborn Kunstseide A.-G. besitzt nach Viskositätsmengen von *W. Fivian* (unveröffentlicht) einen Durchschnittspolymerisationsgrad von 400—500, was einer maximalen Kettenlänge von 2060—2575 Å entspricht. Brauchbare Kunstseide erhält man nach *Staudinger* und *Jurisch*<sup>1)</sup> noch bei einem Durchschnittspolymerisationsgrad von 250 entsprechend einer Kettenlänge von 1300 Å. Diese Grösse ist immer noch ein Mehrfaches der Länge, die den Caseinteilchen zukommen dürfte. Ein Angleich der künstlichen an die natürlichen Eiweissfasern hinsichtlich der Festigkeit ist wohl nur zu erwarten, wenn es auf irgendeinem Wege gelingt, die Parallelorientierung der Peptidketten — und zwar längerer Peptidketten — längs der Faserachse zu verwirklichen.

## 2. Achsenverhältnis der Teilchen in Natriumcaseinat-lösung mit 1,6-n. $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Dieses Beispiel wird gewählt, weil hier die Aggregation am weitesten getrieben ist. Die Berechnung des Achsenverhältnisses ist genau wie im vorhergehenden Abschnitt durchgeführt worden. Die Grösse  $\alpha$  für 4-proz. Natriumcaseinatlösung mit 1,6-n.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  beträgt 1,188, da  $\eta_{\text{rel.}} = 2,13$ .

$\alpha_{n \rightarrow 0} = 1,10$  (interpoliert unter der Annahme, dass die Kurve von  $\alpha$  gegen Caseinkonzentration hier die gleiche Neigung hat wie bei der von uns durchgeführten Konzentrationsreihe mit 0,08-n. KCl).

Man erhält für nicht hydratisierte Teilchen

nach *Burgers*:  $a/b = 18,7$ .

nach *Polson*:  $a/b = 9,2$ .

<sup>1)</sup> *Melliand's Textilber.* **20**, 693 (1939).

Für Teilchen mit einem Hydratationsvolumen von  $1,3 \text{ cm}^3$  für 1 g erhält man

nach *Burgers*:  $a/b = 12,3$ ,

nach *Polson*:  $a/b = 5,8$ .

Weiter vorne wurde aus der Diffusionskonstante nach *W. Kuhn* die Länge der Teilchen berechnet zu

$$a = 1,69 \times 10^{-5} \text{ cm} = 1690 \text{ Å.}$$

Man sieht jetzt allerdings, dass die *Kuhn*'sche Bedingung  $a \gg b$  sehr schlecht erfüllt ist. Immerhin mag dieser Längenwert gut genug sein, um die Grössenordnung des Teilchengewichtes zu berechnen. Nimmt man die Teilchen als kreiszylindrisch an, so errechnet sich auf Grund des *Polson*'schen Achsenverhältnisses ein

$$\text{Teilchengewicht} = 40\,000\,000.$$

Bei diesem Wert darf nur die Grössenordnung  $10^7$  Richtigkeit beanspruchen. Sie genügt jedoch, um unsere Behauptung zu beweisen, dass Salze wie Natriumsulfat in höheren Konzentrationen die Aggregation zwischen den Caseinteilen befördern, denn die durchschnittliche Teilchengrösse in neutralen Caseinatlösungen ohne grössere Salzmengen ist von der Ordnung  $10^5$ .

#### b) Einfluss der Caseinkonzentration auf die Grösse des elektroviskosen Effektes.

Bei der Diskussion des elektroviskosen Effektes war bereits darauf hingewiesen worden, dass derselbe umso grösser ist, je geringer die Caseinkonzentration ist. Auch war dort ausgeführt worden, weshalb diese Tatsache gegen die *Standinger*'sche Auffassung des elektroviskosen Effektes spricht. In Fig. 14 sind die Verhältnisse, wie wir sie beim Casein gefunden haben, graphisch dargestellt.

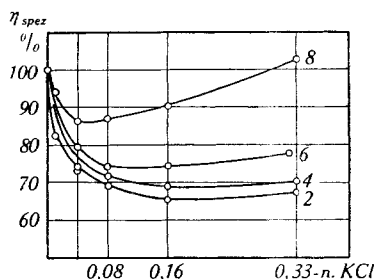


Fig. 14.

Abhängigkeit des elektroviskosen Effektes von der Caseinkonzentration (2, 4, 6 und 8%).

Die spezifischen Viskositäten sind in Prozent der Viskosität der salzfreien Lösung umgerechnet (vgl. Spalte 4 der Tab. 4), damit die Kurven für die verschiedenen Caseinkonzentrationen vergleichbar sind. Zur Vervollständigung des Bildes wurde noch bei 8-proz.

Caseinlösung der Kaliumchlorid-Einfluss untersucht ( $\eta_{\text{spez.}}$  der salzfreien Lösung = 13,06).

Da Salzzusatz die Viskosität bei verdünnten Caseinlösungen stärker herabsetzt als bei konzentrierten, muss der elektroviskose Effekt bei ersteren grösser sein. Ganz analoge Verhältnisse haben *Bungenberg de Jong, Kruyt* und *Lens*<sup>1)</sup> bei Gummi arabicum und Gelatinesolen gefunden. Zur Erklärung nehmen sie an, dass das kapillarelektische Potential der Teilchen bereits durch Konzentrationserhöhung abnimmt, da das Kolloid ja selbst ein Elektrolyt ist. Ihre Messungen der Endosmosegeschwindigkeit durch Gelatinegele und der Leitfähigkeit von Gelatine- und Gummi arabicum-Solen stützen diese Annahme, der wir uns unbedenklich anschliessen können.

c) Zur Frage der Abhängigkeit des Aggregationsgrades von der Caseinkonzentration.

Eine Abhängigkeit des Dispersitätszustandes von der Konzentration ist bei verschiedenen Proteinen nachgewiesen worden, insbesondere durch ultrazentrifugale Messungen<sup>2)</sup>. Für das Casein liegen diesbezügliche Beobachtungen von *Svedberg, Carpenter* und *Carpenter*<sup>3)4)</sup> und von *K. O. Pedersen* vor<sup>5)</sup>. Die ersteren fanden bei Lösungen von Casein nach *van Slyke* und *Baker* in Phosphatpuffer, dass die durchschnittliche Sedimentationskonstante zwischen 0,8 und 2% von der Caseinkonzentration unabhängig ist; wird 0,8% unterschritten, so nimmt die Konstante, d. h. die Teilchengrösse ab. *Pedersen* fand, dass auf anderem Wege dargestelltes Casein bei 2,6% eine etwa doppelt so grosse mittlere Sedimentationskonstante zeigt wie bei 1%. Die Divergenz dieser Ergebnisse mag auf der verschiedenen Darstellungsart des Caseins oder auch auf der Tatsache beruhen, dass der Salzgehalt der untersuchten Lösungen bei *Svedberg* nur 0,017, bei *Pedersen* aber 0,25-molar war. Ganz anders verhielt sich die von *Svedberg, Carpenter* und *Carpenter* untersuchte Caseinfraktion, welche man aus *Hammarsten*-Casein durch Extraktion mit warmem, 70-proz. Alkohol, der 1 cm<sup>3</sup> Salzsäure pro Liter enthält, extrahieren kann. Die Sedimentationskonstante dieser Fraktion ist unterhalb 0,4% konstant, mit steigender Konzentration fällt sie aber, d. h. in diesem Gebiet findet mit sinkender Konzentration Aggregation statt.

Diese Messungen zeigen besonders eindringlich, wie kompliziert das Verhalten des Caseins wegen seiner Heterogenität ist und dass die verschiedenen Komponenten auf ein und denselben Eingriff unter Umständen sehr verschieden reagieren können.

<sup>1)</sup> Koll.-ch. Beih. **37**, 395 (1932).

<sup>2)</sup> *Svedberg* und *Pedersen*, Die Ultrazentrifuge, 1940.

<sup>3)</sup> Am. Soc. **52**, 241 (1930).

<sup>4)</sup> Am. Soc. **52**, 701 (1930).      <sup>5)</sup> Biochem. J. **30**, 948 (1936).



Auch Strömungsdoppelbrechungsmessungen bieten prinzipiell die Möglichkeit, die Frage zu entscheiden, ob mit Konzentrationsänderungen Verschiebungen des Aggregationsgrades verbunden sind. *Signer* und *Gross*<sup>1)</sup> fanden empirisch, dass der Anstieg von  $n_\gamma - n_\alpha$  mit der Konzentration bei Molekelkolloiden proportional dem Produkt aus Konzentration und relativer Viskosität verläuft; also gilt für einen bestimmten Gradienten:

$$\frac{n_\gamma - n_\alpha}{c \cdot \eta_{\text{rel.}}} = K \quad c = \text{konst.}$$

Diese Beziehung ist durch die neueren theoretischen Arbeiten bestätigt worden.

**Tabelle 6.**

Zu: Dispersitätsgrad und Konzentration.

c Caseinkonz.	(n <sub>γ</sub> - n <sub>α</sub> ) · 10 <sup>6</sup> für Gradient:		η <sub>rel.</sub> bez. auf H <sub>2</sub> O	K für Gradient:	
	7360	3140		7360	3140
2%, salzfrei . . . . .	0,175	0,116	1,662	5,25	3,48
4%, salzfrei . . . . .	0,599	0,358	3,078	4,86	2,90
6%, salzfrei . . . . .	1,637	0,906	6,509	4,19	2,32
2% + 0,08-n. KCl . . .	0,182	0,124	1,396	6,51	4,45
4% + 0,08-n. KCl . . .	0,592	0,350	2,382	6,23	3,66
6% + 0,08-n. KCl . . .	2,003	1,119	5,065	6,60	3,68
2% + 0,5-n. KCl . . . .	0,241	0,146	1,388	8,67	5,25
4% + 0,5-n. KCl . . . .	0,752	0,402	2,392	7,88	4,20
6% + 0,5-n. KCl . . . .	3,348	1,886	5,565	10,0	5,25

Veränderungen am Aggregationsgrad müssen sich dadurch äussern, dass *K* für verschiedene Werte von *c* nicht konstant ist. In Tab. 6 sind die Werte von *K* bei den Gradienten 7360 und 3140 für die salzfreien Caseinatlösungen und für die mit 0,08- und 0,5-n. KCl berechnet worden. Die Konstanz der *K*-Werte ist nicht sehr gut, aber ein einheitlicher, ausgeprägter Gang kann nicht festgestellt werden. Es ergibt sich somit, dass aus unsern strömungsoptischen Messungen nicht auf grössere Änderungen am Dispersitätsgrad als Folge variabler Caseinkonzentration geschlossen werden darf. Dieser Befund deckt sich mit den von *Svedberg*, *Carpenter* und *Carpenter* an *van Slyke*-Casein gemachten Beobachtungen.

#### D. Zur Frage nach der Reversibilität der durch die Salze bedingten Aggregationsänderungen.

Diese Frage konnte durch einen einfachen Versuch in bejahendem Sinne beantwortet werden.

<sup>1)</sup> Z. physikal. Ch. [A] **165**, 161 (1933).

Es wurden aus demselben Casein zwei Natriumcaseinatlösungen hergestellt, beide mit 4% Casein bei einem  $p_H$  von ca. 7,5. Ausserdem enthielt

Lösung a:  $Na_2SO_4$ , 1-normal.

Lösung b: KJ, 1-normal.

Die beiden Lösungen mussten sich also hinsichtlich des Aggregationsgrades des Caseins und damit in der Stärke der Strömungsdoppelbrechung sehr stark unterscheiden, da Sulfat aggregierend, Jodid aber dispergierend wirkt. Nach ca. einstündigem Stehen wurden die beiden Lösungen mit dest. Wasser auf das dreifache verdünnt und durch Zusatz von Essigsäure bis zum isoelektrischen Punkt ausgefällt. Bei der Kaliumjodid-haltigen Lösung musste etwas Aceton zugegeben werden, damit eine dichte, gut sedimentierende Flockung entstand. Die Niederschläge wurden bis zum fast völligen Verschwinden der  $SO_4^{''}$ - resp.  $J'$ -Reaktion ausgewaschen. Nun wurden sie nochmals mit der grade erforderlichen Menge Natriumhydroxyd gelöst, zum zweitenmal gefällt und jetzt so lange ausgewaschen, bis überhaupt keine  $SO_4^{''}$ - oder  $J'$ -Ionen mehr im Waschwasser nachzuweisen waren. Darauf folgte Waschen mit Aceton und Trocknen.

Mit diesen beiden Trockenpräparaten wurden nun wieder 4-proz. Natriumcaseinatlösungen hergestellt, beide von gleichem  $p_H$  (7,0) und mit einem Gehalt von 0,12-n. KCl, um den elektroviskosen Effekt aufzuheben.

Die beiden Lösungen zeigten gleiche Viskosität.

$\eta_{\text{spez.}}$  bez. auf 0,12-n. KCl-Lösung,  $a = 1,780$ ,  
 $b = 1,786$ .

Auch bei der Strömungsdoppelbrechung wurde innerhalb der Fehlergrenze Übereinstimmung gefunden, wie aus Tab. 7 hervorgeht.

**Tabelle 7.**  
Reversibilität der Aggregationsänderungen.

Gradient	$(n_\gamma - n_\alpha) \cdot 10^6$		Orientierungswinkel $\varphi$	
	Lösung a	Lösung b	Lösung a	Lösung b
5120	0,494	0,508	55	55
9740	0,846	0,81	55	55
15500	1,17	1,16	56	56
21250	1,49	1,44	57	57

Damit ist bewiesen, dass es sich bei der Beeinflussung des Aggregationsgrades des Caseins in seinen Lösungen durch Salze um vollständig reversible Vorgänge handelt. Es kann sich demnach, da die Änderungen auch sehr rasch verlaufen, kaum um die Knüpfung oder Auflösung von Hauptvalenzen handeln. Die fraglichen Bindungen können entweder Salzcharakter haben, oder sie können

durch reine Nebenvalenzkräfte bedingt sein. Präzisere Aussagen können wir zu dieser Frage auf Grund unserer Versuche nicht machen.

2. Die  $p_H$ -Abhängigkeit der Strömungsdoppelbrechung und der Viskosität bei Natriumcaseinatlösungen (1%) mit und ohne Salz.

Über den Einfluss des  $p_H$  auf die Viskosität von Caseinlösungen liegen bereits von verschiedenen Autoren Messungen vor. Man findet ähnlich wie bei den meisten andern Proteinen im sauren und im alkalischen Gebiet je ein Maximum (siehe *Pauli-Valkó*<sup>1)</sup>, S. 256). Es schien uns von Interesse, diese Resultate durch Messungen der Strömungsdoppelbrechung zu ergänzen. Dabei war vor allem Aufschluss über die Frage zu erhoffen, ob die Zunahme der Viskosität bei Erhöhung des  $p_H$  über 7 hinaus auf eine Verstärkung des elektroviskosen Effektes oder auf eine Desaggregation der Teilchen oder auf beides zurückzuführen ist. Eine Verstärkung des elektroviskosen Effektes ist zu erwarten, weil bei  $p_H$  7 sicher noch nicht alle sauren Gruppen in der anionischen Form vorliegen und somit eine Erhöhung der Ladung bei Zugabe von Alkali noch möglich ist. Eine Erhöhung des Dispersitätsgrades ist ebenfalls denkbar, denn dass umgekehrt das Herabsetzen des  $p_H$  Aggregation bewirkt, ergibt sich aus der Tatsache, dass Natriumcaseinatlösung bei Salzsäure-Zusatz ungefähr bei  $p_H$  5,5 auszuflocken beginnt.

Es wurden zwei Versuchsreihen angesetzt. Die Caseinkonzentration der fertigen Lösungen betrug stets 4 g pro 100 cm<sup>3</sup> Lösung bei steigenden Zusätzen von Natriumhydroxyd; die Lösungen der ersten Reihe waren salzfrei, diejenigen der zweiten Reihe enthielten 0,33 Mol Kaliumbromid pro Liter, also genügend, um jeden elektroviskosen Effekt auszuschalten.

Fig. 15 gibt in graphischer Darstellung die spezifischen Viskositäten für die beiden Versuchsreihen in Abhängigkeit vom  $p_H$ <sup>2)</sup>. Bei diesen Messungen wurde das Viskosimeter wegen der erhöhten Gefahr der Kohlendioxyd-Absorption aus der Luft mit einem Aufsatz versehen, der es gestattete, unter Kohlendioxyd-Abschluss zu arbeiten. Dieser Aufsatz war genau dem von *Krøyt* und *Lier*<sup>3)</sup> beschriebenen nachgebildet.

Fig. 16 und 17 geben die zugehörigen Strömungsdoppelbrechungswerte; die 5 Kurven wurden erhalten mit den Gradienten 1410, 1940, 3140, 4680 und 7360 (von unten nach oben)<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Kolloidchemie der Eiweisskörper 1933.

<sup>2)</sup> Die  $p_H$ -Messungen wurden potentiometrisch unter Verwendung einer Glaselektrode und einer Kalomelnormalelektrode ausgeführt.

<sup>3)</sup> Koll.-ch. Beih. **28**, 407 (1929).

<sup>4)</sup> Eine Beeinflussung des Orientierungswinkels durch die  $p_H$ -Verschiebungen konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, denn diese Messungen waren mit dem alten Strömungsapparat gemacht worden, der höhere Gradienten nicht zu erreichen gestattete. Die allfälligen Differenzen sind unter diesen Bedingungen von der Größenordnung der Fehlerbreite.

Was zunächst auffällt ist, dass der Verlauf der Kurven mit und ohne Salz sehr ähnlich ist. Das Viskositätsmaximum liegt bei  $p_H$  9,5. *J. Loeb*<sup>1)</sup> findet das Maximum für 1-proz. Natriumcaseinat-lösung bei  $p_H$  11,5. Auch *Kruyt* und *Lier*<sup>2)</sup> finden das Maximum für 0,5, 0,75, 1,0 und 1,5 % Casein stets bei 11,5. Dagegen liegt nach *Zoller*<sup>3)</sup> für 9-proz. Lösung das Maximum bei  $p_H$  9,2. Eigene, vorerst qualitative Versuche haben gezeigt, dass das Maximum bei noch höheren Caseinkonzentrationen nach noch tieferen  $p_H$  verschoben wird. Die Kenntnis dieser Konzentrationsabhängigkeit beseitigt den scheinbaren Widerspruch, in dem unser Resultat für die 4-proz. Lösung zu den Befunden anderer Autoren auf den ersten Blick zu stehen scheint.

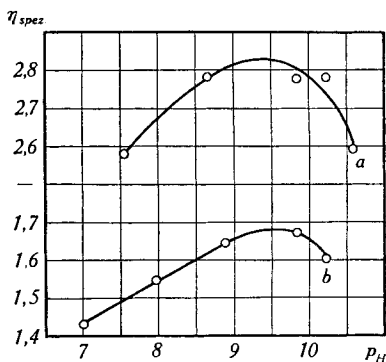


Fig. 15.

$p_H$ -Abhängigkeit der Viskosität bei 4-proz. Natrium-caseinat-lösung, *a*: ohne Salz, *b*: mit 0,33-n. KBr.

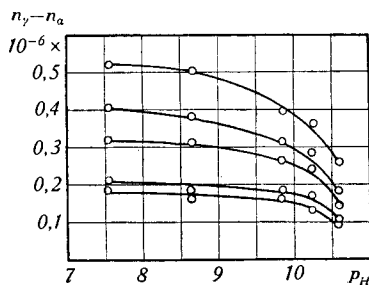


Fig. 16.

$p_H$ -Abhängigkeit der Strömungs-doppelbrechung bei 4-proz. Natriumcaseinat-lösung ohne Salz.

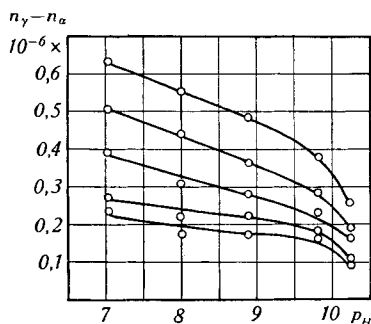


Fig. 17.

$p_H$ -Abhängigkeit der Strömungsdoppelbrechung bei 4-proz. Natriumcaseinat-lösung mit 0,33-n. KBr.

<sup>1)</sup> Die Eiweisskörper, 1924.

<sup>2)</sup> Koll.-ch. Beih. **28**, 407 (1929).

<sup>3)</sup> Science (New York) **50**, 49 (1919).

Dagegen steht zu diesen Resultaten in vorläufig ungeklärtem Gegensatz, dass *Ettisch* und *Schulz*<sup>1)</sup> bei salzfreier, 3-proz. Natriumcaseinatlösung überhaupt kein  $p_H$ -Maximum fanden, indem die Viskosität von  $p_H$  7 an aufwärts ständig absank. Jedoch schon bei einem Zusatz von nur 0,005-n. NaCl trat das Maximum bei  $p_H$  11,5 auf; grössere Salzkonzentrationen konnten seine Lage nicht weiter verschieben.

Bei den stärker alkalischen Lösungen ist prinzipiell damit zu rechnen, dass irreversible hydrolytische Spaltungen bei den Viskositätsänderungen eine Rolle spielen. Dieselben müssen im Gegensatz zu den Vorgängen, die uns in dieser Arbeit interessieren, an ihrem zeitlichen Gang zu erkennen sein. Fig. 18 zeigt den über längere Zeit verfolgten Viskositätsabfall zweier 4-proz. Caseinatlösungen, von denen die eine zu Beginn des Versuches ein  $p_H$  von 10, die andere ein solches von 12 zeigte.

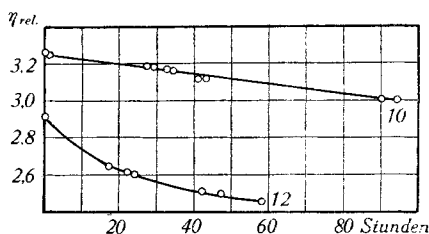


Fig. 18.

Zeitliche Änderung der Viskosität 4-proz. Natriumcaseinatlösung bei  $p_H$  10 und 12.

Nach 20 Stunden — diese Zeit hatten *Ettisch* und *Schulz* vom Mischen der Lösungen bis zum Viskosimetrieren verstreichen lassen — ist  $\eta_{rel.}$  bei  $p_H$  10 um 2,2 %, bei  $p_H$  12 um 9,6 % gesunken. Da unsere Messungen höchstens eine halbe Stunde nach dem Zufügen der Natronlauge durchgeführt wurden, liegt der hydrolytisch bedingte Viskositätsabfall ausserhalb der Messfehlergrenze.

Bei der Betrachtung der Kurven der Fig. 15 ergibt sich, dass die Viskositätsänderungen bei Zugabe von Natriumhydroxyd zur Hauptsache durch Vorgänge ausgelöst werden, die durch Kaliumbromid nicht verhindert werden. Die Zunahme der Viskosität mit steigendem  $p_H$  kann hier nicht darauf zurückgeführt werden, dass der elektroviskose Effekt wegen der Zunahme der negativen Ladungen der Caseinteilchen grösser wird. Sonst müsste das Maximum durch den Salzzusatz ausgeebnet werden. Bei anderen Proteinen ist das weitgehend der Fall, so bei Gelatine (*Mosimann*<sup>2)</sup>). Hier aber ist die Grösse des elektroviskosen Effektes im untersuchten Gebiet sogar überraschend wenig vom  $p_H$  abhängig, wenn nicht irgendwelche

<sup>1)</sup> Bioch. Z. **239**, 48 (1931).

<sup>2)</sup> Diss. Bern 1937.

andere Komplikationen mit im Spiele sind. Dies geht aus Tab. 8 hervor. Die Werte in der zweiten Spalte sind wie folgt berechnet:

$$[\eta] = \frac{\eta_{\text{spez. (salzhaltig) bei } p_H x}}{\eta_{\text{spez. (salzfrei) bei } p_H x}} \cdot 100$$

Sie geben also die Viskosität der salzhaltigen Lösung in Prozenten derjenigen der salzfreien Lösung wieder. Die zu gleichen  $p_H$  gehörigen Werte sind aus den Kurven der Fig. 15 entnommen.

Tabelle 8.

$p_H$	$[\eta]$	$p_H$	$[\eta]$
7,5	58,1	9,0	59,0
8,0	58,0	9,5	59,4
8,5	58,2	10,0	59,1

Wenn man die Differenz zu 100 als ein Mass für die Grösse des elektroviskosen Effektes betrachten will, so erweist sich derselbe als praktisch unabhängig vom  $p_H$ . In Wirklichkeit trifft das wohl nicht zu. Die Steigerung des elektroviskosen Effektes entzieht sich vielmehr nur der Beobachtung, weil ja die  $p_H$ -Erhöhung selbst schon von einer Zunahme der Elektrolytkonzentration ( $\text{Na}'$ - und  $\text{OH}'$ -Ionen) begleitet ist.

Der durch Salz nicht unterdrückte Viskositätsanstieg findet eine zwanglose Deutung durch die Annahme, dass mit wachsendem  $p_H$  der Dispersitätsgrad des Caseins entsprechend dem früher<sup>1)</sup> skizzierten Schema zunimmt. Natriumhydroxyd wirkt ähnlich, aber noch stärker dispergierend wie Kaliumjodid. Die Stärke der Strömungsdoppelbrechung muss dann erwartungsgemäss mit steigender Viskosität fallen, was sie ja tatsächlich auch tut (Fig. 16 und 17). Diese Abnahme der Strömungsdoppelbrechung mit steigendem  $p_H$  zeigt erneut, dass die Auffassung von *Küntzel* und *Doehner* über das Zustandekommen des optischen Effektes beim Casein nicht richtig sein kann. Wenn es sich um Deformierungsdoppelbrechung runder, durch Quellung erst plastisch gewordener Teilchen handelte, so müsste mit steigendem  $p_H$  ( $n_\gamma - n_\alpha$ ) zunehmen, denn es ist unvorstellbar, dass beim Erhöhen des  $p_H$  über 7 eine Entquellung stattfindet. Noch viel weniger lässt sich übrigens nach *Küntzel* und *Doehner* die sehr starke Zunahme der Doppelbrechung durch Natriumsulfat erklären, bei dem eine starke Quellwirkung ausgeschlossen ist.

$p_H$ -Abhängigkeit der Teilchengrösse ist bei Proteinen schon oft nachgewiesen worden. Diesbezügliche Resultate ultrazentrifugaler Untersuchungen haben *Svedberg* und *Pedersen*<sup>2)</sup> zusammengestellt. Besonders bemerkenswert ist, dass bei mono- und paucidispersen

<sup>1)</sup> Helv. **24**, 452 (1941).

<sup>2)</sup> Die Ultrazentrifuge, 1940.

Systemen die Dispersitätsänderungen meist sprunghaft bei Über- oder Unterschreitung ganz bestimmter  $p_H$ -Werte vor sich gehen. Beim Casein, das von vornherein polydispers ist, haben wir dagegen eine kontinuierliche Dispersitätsänderung, indem sich statistisch betrachtet das Häufigkeitsmaximum sukzessive zugunsten der kleineren Teilchen (bei  $p_H$ -Erhöhung) verschiebt.

*Holwerda*<sup>1)</sup> und *Subba Ramaiah*<sup>2)</sup> haben Streulichtuntersuchungen an Natriumcaseinatlösungen angestellt. Ihre Schlussfolgerungen stimmen dahin überein, dass die durchschnittliche Teilchengrösse mit steigenden  $p_H$  abnimmt und umgekehrt. Auch *Ettisch* und *Schulz* nehmen eine Aufspaltung der Caseinteilchen bei Laugezusatz an, und zwar stellen sie sich vor, dass durch die Vermehrung der gleichsinnigen Ladungen zuerst ein Voneinanderabspreizen der Peptidketten und dann, wenn die Expansionskräfte die Kohäsionskräfte überwiegen, ein Zerfall in kleinere Bruchstücke stattfindet. Hierbei sollen, soweit es sich um reversible Vorgänge handelt ( $p_H$  nicht über 11,5, Dauer nicht über 20 Stunden), nur Nebenvalenzen gelöst werden. Im wesentlichen decken sich unsere eigenen Anschauungen über den Spaltungsmechanismus mit den angeführten, wobei wir aber für den Viskositätsanstieg nicht oder jedenfalls nicht in erster Linie die Spreizung der Teilchen, sondern ihre Längsaufspaltung verantwortlich machen. *Ettisch* und *Schulz* dagegen glauben, dass jegliche Spaltung, ob reversibel oder irreversibel, zu einem Abfall der Viskosität führen muss. Aus all unsern Versuchen geht wohl deutlich hervor, dass diese Ansicht den Tatsachen nicht gerecht wird.

Ein besonderes Problem ist der Viskositätsabfall nach Überschreiten des Maximums, also bei unsern 4-proz. Lösungen bei  $p_H > 9,5$ . *Wo. Pauli*<sup>3)</sup> vertritt die Ansicht, dass, wenn das Proteinanion einmal seinen maximalen Ladungszustand erreicht hat, ein weiterer Zusatz von Alkali resp. Säure genau die gleiche, nämlich aktivitätsvermindernde Wirkung hat wie Neutralsalz. Die Tatsache, dass bei unserer Versuchsreihe mit Kaliumchlorid die Viskosität oberhalb  $p_H$  9,5 fast genau denselben Abfall zeigt, wie bei Anwesenheit von Salz, wird durch diese Theorie nicht erklärt.

*Ettisch* und *Schulz* machen für den Viskositätsabfall, der bei ihnen erst oberhalb  $p_H$  11,5 eintritt, die hydrolytische Spaltung von Peptidketten verantwortlich. Hierum kann es sich im wesentlichen bei uns nicht handeln, da die Kurve ja schon bei  $p_H$  9,5 umkehrt. Auch haben wir immer gleich nach dem Zumischen der Natronlauge viskosimetriert, wo die Hydrolyse noch keinen merklichen Umfang

1) Vereen. Exploitat. Proofzuiveloederij Horn. Versl. 1931, S. 31.

2) Proc. Indian Acad. Sci. 5, 128 (1937).

3) *Pauli-Valkó*, Kolloidchemie der Eiweisskörper, 1933.

angenommen haben kann. Ohne aus unsern beschränkten Versuchsdaten zu weitgehende Schlüsse ziehen zu wollen, erachten wir es für sehr wahrscheinlich, dass sich hier ein anderer Spaltungsvorgang bemerkbar macht, der sich von dem bisher stets betrachteten dadurch grundlegend unterscheidet, dass er sowohl Viskosität wie Strömungsdoppelbrechung herabsetzt. Im Einklang mit den Beobachtungen würde die Annahme einer Querspaltung stehen, welche zu einer Verkleinerung des Achsenverhältnisses führt.

#### Einfluss der Neutralsalze auf das $p_H$ von 4-proz. Natriumcaseinatlösung.

Es ist bekannt, dass das  $p_H$  von Proteinlösungen durch Zusatz von Neutralsalzen nicht unbeträchtliche Verschiebungen erleiden kann. *Robinson, Gortner und Palmer*<sup>1)</sup> haben die Bindungsfähigkeit für  $OH'$ -Ionen bei Proteinen untersucht und gefunden, dass dieselbe durch Neutralsalzzusatz erhöht wird. Dies bedeutet, dass Salzzusatz zu einer Caseinatlösung das  $p_H$  derselben herabsetzt. Die Autoren stellen auch fest, dass die Halogenide des Kaliums alle ungefähr denselben depressorischen Einfluss haben. Es war also immerhin die Frage zu prüfen, ob und wie weit etwa die mit dem Salzzusatz zusammenhängenden  $p_H$ -Verschiebungen für Effekt A, B oder C verantwortlich zu machen sind. Zu diesem Zweck bestimmten wir selbst die  $p_H$ -Änderungen, welche die bisher benützten Salze bei 4-proz. Natriumcaseinatlösung hervorrufen. Die Salze wurden in einer Konzentration von 0,33-n. zugesetzt. Die Resultate sind in Tab. 9 zusammengestellt.

**Tabelle 9.**  
 $p_H$ -Verschiebung durch Salze.

4% Casein +	$p_H$	4% Casein +	$p_H$
salzfrei . . . . .	7,53	0,33-n. KCl . . . .	7,23
0,33-n. KJ . . . .	7,37	0,33-n. NaCl . . . .	7,18
0,33-n. KBr . . . .	7,32	0,33-n. $Na_2SO_4$ . .	7,12

Die Salze wirken alle in gleicher Richtung, und auch in der Stärke der Wirkung differenzieren sie sich nicht sehr stark. Bei einer Wiederholung der Versuche wurde nochmals dieselbe Reihenfolge nach der Stärke der Wirkung gefunden. Mit 0,33-n. Salz sind wir schon im Gebiet von Effekt B, den wir als Aggregation-Desaggregation gedeutet haben. Man sieht jetzt, dass die  $p_H$ -Verschiebungen durch die Salze so klein sind, dass sie für die Entstehung der sehr beträchtlichen B-Effekte nicht verantwortlich sein können. Zudem wirken die Salze auf das  $p_H$  alle in gleicher Richtung, auf die Strömungsdoppelbrechung aber nicht.

<sup>1)</sup> J. Phys. Chem. **36**, 1857 (1932).



Für Kaliumbromid haben wir schliesslich die  $p_H$ -Depression bei verschiedenen Konzentrationen des Salzes gemessen. Über das Resultat dieser Messungen gibt Fig. 19 Auskunft.

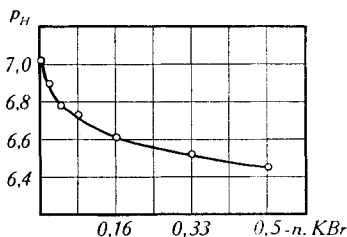


Fig. 19.

Einfluss von Kaliumbromid auf das  $p_H$  von 4-proz. Natriumcaseinatlösung.

Die Kurve mahnt allerdings an die auch am Anfang stark abfallenden Viskositätskurven. Trotzdem kann der Viskositätsabfall (Effekt A) nicht durch den  $p_H$ -Gang bedingt sein, denn aus Fig. 15 geht ganz klar hervor, dass eine salzhaltige Lösung auch dann eine viel kleinere Viskosität zeigt als eine salzfreie, wenn beide genau dasselbe  $p_H$  aufweisen.

Für eine Erklärung des Effektes C, der durch ein Maximum geht, ist aus diesen  $p_H$ -Messungen ebenfalls nicht die leiseste Andeutung zu entnehmen.

### 3. Untersuchungen an Lösungen von Casein in Harnstoff-Wasser-Gemischen.

Konzentrierte Harnstofflösungen sind bekannt für ihre quellende, lösende und dispergierende Wirkung auf Proteine. Einerseits sind gewisse, in Wasser unlösliche Proteine in starken Harnstofflösungen löslich — zu ihnen gehört auch das Casein —, andererseits bewirkt Harnstoffzusatz zu wässrigen Eiweisslösungen oft weitgehende Dissoziation, d. h. Herabsetzung der Teilchengrösse. In manchen Fällen bewirkt Harnstoff auch eine irreversible Denaturierung.

Für Ovalbumin z. B. fanden *Williams* und *Watson*<sup>1)</sup>, dass in 50-proz. Harnstofflösung das mittlere Molekulargewicht nur 21 000 gegenüber 36 000 in Wasser beträgt. *Wöhlisch*<sup>2)3)</sup> berichtet, dass Harnstoffzusatz zu Fibrinogenlösungen das Fadenziehen, die Viskositätsanomalien und die Strömungsdoppelbrechung herabsetzt (vgl. auch *Heim*<sup>4)</sup>). *Mosimann*<sup>5)</sup> hat die Viskositätsverhältnisse von Gelatinelösungen in Harnstoff-Wasser-Gemischen eingehend untersucht. Er findet, dass die Erscheinungen, die durch Aggregation bedingt sind, wie Alterung und Strukturviskosität, in diesem Lösungs-

<sup>1)</sup> Nature (London) **139**, 506 (1937).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **285**, 200 (1936).

<sup>4)</sup> Bioch. Z. **291**, 88 (1937).

<sup>3)</sup> Koll. Z. **85**, 179 (1938).

<sup>5)</sup> Diss. Bern 1937.

mittel verschwinden. Er nimmt an, dass diese Lösungen die Gelatine in molekularer Dispersion enthalten. *Mehl*<sup>1)</sup> berichtet, dass die Strömungsdoppelbrechung von Myosin- und von Tabakmosaik-Virus-Lösungen bei Zusatz von genügend Harnstoff verschwindet. Auch hier muss es sich offenbar um Desaggregation, und zwar von grossen, langgestreckten Teilchen in kleinere, weniger anisodimensionale handeln.

Für Casein fanden *Burk* und *Greenberg*<sup>2)</sup> in 6,66-n. Harnstofflösungen osmotisch beim isoelektrischen Punkt ein Molekulargewicht von 33 600, während die Werte für Caseinatlösungen bei 100 000 oder darüber liegen<sup>3)4)5)</sup>.

Neuestens haben *Küntzel* und *Doehner*<sup>6)</sup> die Teilchengrösse des Caseins ebenfalls osmotisch in 6,6-n. Harnstofflösung bestimmt; sie fanden ein Durchschnittsgewicht von 120 000. Allerdings arbeiteten sie nicht mit Lösungen von gefällttem und gereinigtem Casein wie *Burk* und *Greenberg*, sondern mit Magermilch, welche direkt mit Harnstoff versetzt worden war. Bedenkt man, dass dieselben Autoren für das Casein der unveränderten Magermilch durch ultramikroskopisches Auszählen ein mittleres Teilchengewicht von ca.  $10^{10}$  fanden, so zeigen diese Versuche besonders deutlich die sehr stark desaggregierende Wirkung des Harnstoffes.

Im Harnstoff schien uns demnach ein Reagens gegeben, mit dessen Hilfe vielleicht unsere Hypothese zu beweisen war, dass beim Casein steigende Viskosität und abnehmende Strömungsdoppelbrechung — wie man sie z. B. bei Kaliumjodid- oder Natriumhydroxyd-Zusatz beobachten kann — auf eine Desaggregation zurückzuführen ist. Wenn mit steigender Harnstoffkonzentration derselbe Effekt zu erreichen ist, so würde das für unsere Auffassung eine sehr starke Stütze bedeuten, denn, wie aus den zitierten Arbeiten hervorgeht, steht die dispergierende Wirkung des Harnstoffes ausserhalb jeden Zweifels.

Zunächst untersuchten wir die Wirkung eines Harnstoffzusatzes zur Natriumcaseinatlösung. Es wurden drei Lösungen — aus der gleichen Stammlösung hergestellt — miteinander verglichen, und zwar mit 0, 8 und 20 g Harnstoff in 100 cm<sup>3</sup>-Lösung; die Caseinkonzentration betrug immer 4%. Wie aus Tab. 10 hervorgeht, wird wohl erwartungsgemäss die Strömungsdoppelbrechung herabgesetzt, aber auch die Viskosität sinkt mit steigender Harnstoffkonzentration, wenn auch nicht sehr stark.

Das Absinken der Viskosität kann sehr wohl auf einer Beeinflussung des Ladungszustandes im Sinne einer Verminderung beruhen, indem der Harnstoff den Aktivitätskoeffizienten des Caseinsalzes

<sup>1)</sup> Cold Spring Harbor Sympos. Quantitat. Biol. **6**, 218 (1938).

<sup>2)</sup> J. Biol. Chem. **87**, 197 (1930).

<sup>3)</sup> Am. Soc. **52**, 241 (1930).

<sup>5)</sup> *Pedersen*, Bioch. J. **30**, 948 (1936).

<sup>4)</sup> Am. Soc. **52**, 701 (1930).

<sup>6)</sup> Koll.-ch. Beih. **51**, 277 (1940).

und damit den elektroviskosen Effekt herabsetzt. Jedenfalls ist von dieser Seite mit einem Einfluss unbekannter Grösse zu rechnen.

**Tabelle 10.**

Einfluss von Harnstoff auf eine 4-proz. Natriumcaseinatlösung.

	% Harnstoff		
	0	8	20
$(n_{\gamma} - n_{\alpha}) \cdot 10^6$ für $G = 6170$ . . . . .	0,64	0,41	0,24
$\eta_{\text{spez.}}$ bez. auf die Harnstofflösung . . . .	2,39	2,18	2,10

Deshalb wurde eine andere Versuchsreihe durchgeführt, bei der das Casein direkt ohne Zusatz von Natriumhydroxyd in verschiedenen konzentrierten Harnstofflösungen aufgelöst wurde. Diese Lösungen wurden wie folgt hergestellt: 0,400 g Casein (Trockengewicht) wurde in 10 cm<sup>3</sup>-Kölbchen eingewogen und mit der Harnstofflösung<sup>1)</sup> gewünschter Konzentration unter Rollen zur Lösung gebracht; schliesslich wurde mit derselben Harnstofflösung bis zur Marke aufgefüllt.

Es wurden 4 Lösungen untersucht, bei denen die Konzentration der zur Lösung des Caseins verwendeten Harnstofflösungen 55,5, 50,0, 44,4 und 38,8 g pro 100 cm<sup>3</sup> betrug. Bei noch niedrigeren Harnstoffkonzentrationen als 38 % war es nicht mehr möglich, das Casein vollständig in Lösung zu bringen oder aber die Lösungen enthielten sehr kleine, mit der Lupe deutlich sichtbare Gelklümpchen. Diese letzte Tatsache sowie der Umstand, dass die Lösung in 38,8-proz. Harnstoff trüber war als die in höher konzentriertem, zeigt ganz deutlich, dass das Dispergierungsvermögen der Harnstofflösungen mit steigender Konzentration derselben zunimmt. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist aus Fig. 20 und 21 zu entnehmen.

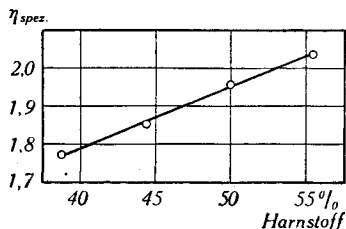


Fig. 20.

Viskosität 4-proz. Caseinlösung in Harnstoff-Wasser-Gemischen.

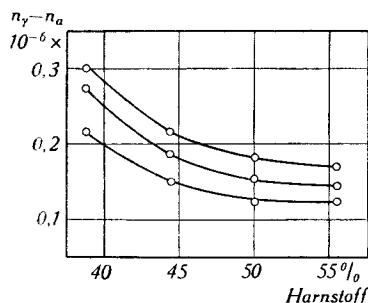


Fig. 21.

Strömungsdoppelbrechung 4-proz. Caseinlösungen in Harnstoff-Wasser-Gemischen.

Gradienten: 4680

6170

v. u. n. o. 7360

<sup>1)</sup> Es ist wesentlich, dass immer frisch bereitete, nicht erwärmte Harnstofflösung verwendet wird, da beim Stehen nach wenigen Tagen das  $p_H$  wegen Hydrolyse merklich ansteigt.

Hier, wo Ladungsunterschiede kaum merklich ins Gewicht fallen können, erfüllt der Gang von Viskosität und Strömungsdoppelbrechung vollkommen unsere Erwartungen: Zunehmende Dispersität bedingt steigende Viskosität und fallende Doppelbrechung. Die absolute Stärke der Doppelbrechung ist geringer als bei den Caseinatlösungen, ganz entsprechend dem grösseren Dispersitätsgrad.

Die Orientierungswinkel konnten wegen der schwachen Doppelbrechung wenig genau bestimmt werden. Später wurde im neuen Metallapparat eine allerdings nur 3,6% enthaltende Caseinlösung in 50-proz. Harnstoff bis zu hohen Gradienten gemessen. Der Orientierungswinkel bewegte sich zwischen  $G = 5\,000$  bis  $30\,000$  ganz schwach ansteigend von ca.  $48\text{--}50^\circ$  (siehe Fig. 8, Kurve  $e$ )<sup>1)</sup>. Die Werte liegen also tiefer als die für Natriumcaseinat gemessenen.

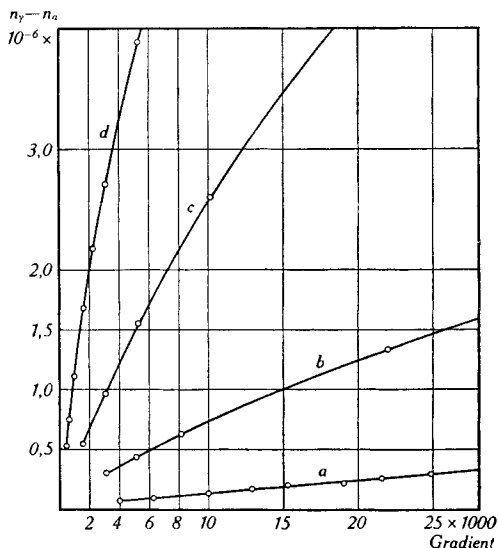


Fig. 22.

Strömungsdoppelbrechung in Abhängigkeit vom Gradienten für: 3,6-proz. Caseinlösung in 50-proz. Harnstoff (Kurve  $a$ ), 4-proz. Natriumcaseinatlösung, salzfrei (Kurve  $b$ ), 4-proz. Natriumcaseinatlösung + 0,7-n.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Kurve  $c$ ), 4-proz. Natriumcaseinatlösung + 1,6-n.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Kurve  $d$ ).

Dies spricht ebenso für einen grösseren Dispersitätsgrad wie die Tatsache, dass bei diesem Versuch die gegen  $G$  aufgetragene Kurve von  $n_\gamma - n_\alpha$  eine Gerade darstellt und nicht konkav gegen die  $G$ -Achse gekrümmt ist, wie das bei allen Natriumcaseinatlösungen der Fall ist. Diese Kurve der Casein-Harnstoff-Lösung ist in Fig. 22 wiedergegeben. Dazu sind die entsprechenden Kurven für 4-proz. Natriumcaseinatlösung salzfrei, mit 0,7-n. und mit 1,6-n.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  eingezeichnet. Aus dieser Darstellung geht besonders deutlich hervor,

<sup>1)</sup> Helv. **24**, 454 (1941).

wie ausserordentlich stark der optische Effekt vom Lösungszustand des Caseins abhängig ist. Unsere Auffassung von Effekt *B* als Veränderung des Dispersitätsgrades steht mit allen diesen Versuchen in Einklang.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit der Viskosität von der Caseinkonzentration bei stets gleich bleibender Harnstoffkonzentration (50 g pro 100 cm<sup>3</sup> Lösung) untersucht. Die Kurve (Fig. 23), welche sich aus den Werten der Tab. 11 ergibt, zeigt einen ganz analogen Verlauf, wie die für Natriumcaseinat (siehe Fig. 12), d. h. die Viskosität steigt stärker als proportional mit der Konzentration.

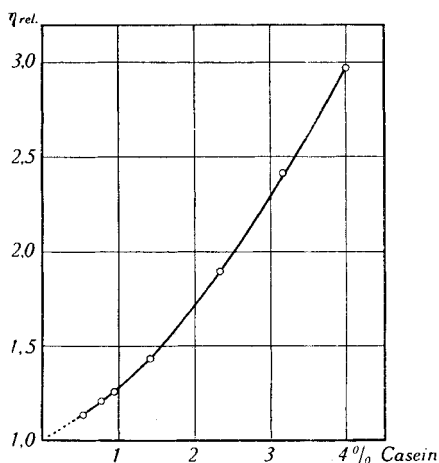


Fig. 23.

Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität in 50-proz. Harnstoff.

In Tab. 11 sind in der 3. Kolonne die Werte für  $\alpha$  aus der Gleichung von Arrhenius (vgl. S. 577) wiedergegeben. Die Konstanz von  $\alpha$  ist hier viel besser als bei den Caseinatlösungen, wenn auch ein schwacher Gang der Werte (wie dort steigend mit steigender Konzentration) unverkennbar ist.

Tabelle 11.

Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität in 50-proz. Harnstoff.

<i>n</i> Caseinkonzentration g/100 cm <sup>3</sup> Lösung	$\eta_{rel.}$ bez. auf 50-proz. Harnstofflösung	$\alpha$
0,520	1,134	1,274
0,765	1,203	1,273
0,950	1,254	1,269
1,408	1,4305	1,290
2,340	1,889	1,311
3,175	2,408	1,320
4,000	2,790	1,314

Interpoliert man, wie wir es schon früher taten,  $\alpha$  auf die Konzentration = 0, so erhält man erst eine Grösse, die geeignet ist, um die Viskositäten ein und derselben Substanz in verschiedenen Lösungsmitteln miteinander zu vergleichen.

$\alpha_{n \rightarrow 0}$ für Casein in 50-proz. Harnstoff	= 1,27
$\alpha_{n \rightarrow 0}$ für Natriumcaseinatlösung, $p_H$ 7	= 1,25
$\alpha_{n \rightarrow 0}$ für Natriumcaseinatlösung + 0,08-n. KCl	= 1,16

Auch der Umstand, dass  $\alpha_{n \rightarrow 0}$  für Casein in Harnstoff grösser ist, nicht nur als für Natriumcaseinatlösungen bei aufgehobenem elektroviskosem Effekt, sondern sogar auch grösser als für solche, bei denen dieser viskositätserhöhende Effekt voll wirksam ist, spricht dafür, dass die Desaggregation in der von uns angenommenen Art und Weise verläuft.

#### Berechnung der Dimensionen der Caseinteilchen in 50-proz. Harnstofflösung.

Die Berechnung des Achsenverhältnisses aus der Viskosität wurde diesmal nur nach *Polson* durchgeführt; nach *Burgers* bekäme man wieder etwa den doppelten Wert. Unter Zugrundelegung von  $\alpha_{n \rightarrow 0} = 1,27$  errechnet sich:

$$a/b = 16,6$$

Supponieren wir wie früher für 1 g Casein ein Hydratationsvolumen von 1,3 cm<sup>3</sup>, dann reduziert sich das Achsenverhältnis:

$$a/b = 12,1$$

Unter Benützung des von *Burk* und *Greenberg* bestimmten mittleren Molekulargewichtes von 33 600 ergeben sich für die Teilchen, wenn wir kreiszylindrische Form annehmen, folgende Dimensionen:

$$\begin{aligned} \text{Volumen} &= 7,2 \times 10^{-20} \text{ cm}^3 \\ \text{Länge} &= 235 \text{ Å} \\ \text{Dicke} &= 19,4 \text{ Å} \end{aligned}$$

Auch ein solches Teilchen kann keine gestreckte Peptidkette sein, denn die 280 in ihm enthaltenen Aminosäuren ergäben eine Fadenmolekel von 980 Å Länge.

Als wesentlichstes Ergebnis aller bisherigen Versuche sei nochmals festgehalten, dass der Dispersitätsgrad des Caseins in Lösung durch Neutralsalze, sowie auch durch andere Lösungsgenossen (z. B. Harnstoff) spezifisch beeinflusst wird. Aggregation geht parallel der Längsachse der langgestreckten Teilchen vor sich, so dass die Viskosität etwas sinkt, während die Strömungsdoppelbrechung stärker ansteigt. Desaggregation hat die entgegengesetzten Wirkungen.

Nachdem wir uns ausführlich mit dem elektroviskosen Effekt (A) und mit dem Dispersitätseffekt (B) beschäftigt haben, bleibt uns noch übrig, eine Deutung für Effekt C zu suchen.

Die erste Frage, die wir uns diesbezüglich stellten, war die, ob Effekt C für das Casein spezifisch ist oder ob man ihn auch bei andern Proteinsystemen wiederfindet.

#### 4. Der Einfluss von Kaliumchlorid auf die Strömungsdoppelbrechung und Viskosität anderer Proteinsysteme.

##### A. Tabakmosaikvirus.

Da gerade Viruslösung von einer im hiesigen Institut ausgeführten Arbeit<sup>1)</sup> zur Verfügung stand und dieselbe sehr deutliche und gut messbare Strömungsdoppelbrechung zeigte, untersuchten wir an ihr den Einfluss variabler Mengen von Kaliumchlorid. Die Lösungen enthielten nur 0,002 g Virus im Liter, so dass ihre Viskosität praktisch gleich der des Lösungsmittels war. Da die Messungen noch im alten Apparat durchgeführt worden waren, trat Turbulenz schon bei  $G > 2000$  ein, was sich hier deutlich in einem Abfallen von  $n_\gamma - n_\alpha$  beim weiteren Erhöhen des Gradienten bemerkbar machte. In Fig. 24 ist die Abhängigkeit von  $n_\gamma - n_\alpha$  von der Kaliumchlorid-Konzentration für die beiden Gradienten 1410 und 1940 wiedergegeben.

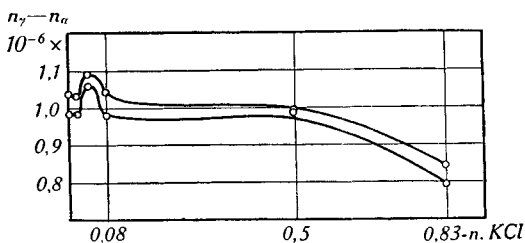


Fig. 24.

Einfluss von Kaliumchlorid auf die Strömungsdoppelbrechung von Tabakmosaikviruslösung.

Die Orientierungswinkel liegen bei diesen Gradienten zwischen 81 und 82°; ein über die Fehlergrenze hinausgehender Einfluss des Kaliumchlorids konnte nicht bemerkt werden.

Es interessiert in diesem Zusammenhang nur das sehr deutlich ausgebildete Maximum von  $n_\gamma - n_\alpha$  bei 0,04-n. KCl. Im Tabakmosaikvirus liegt also ein weiteres Proteinsystem vor, bei dem der fragliche Salzeffekt C beobachtet werden kann.

##### B. Eiklar.

Als weiteres, leicht zugängliches Proteinsystem wurde eine Eiklarlösung gemessen. Böhm und Signer<sup>2)</sup> haben gezeigt, dass von den drei Proteinen des Eiklars Ovoglobulin, Ovalbumin und Ovomucoid nur das Globulin Strömungsdoppelbrechung zeigt. Für unsere Untersuchung wurden die drei Komponenten nicht getrennt. Das Eiklar wurde sorgfältig vom Eigelb geschieden. Nachdem auf dunkler Unterlage die Hagelschnüre mit der Pinzette herausgefischt worden waren, wurde mit Natriumhydroxydlösung vom  $p_H$  8,5 (dies

<sup>1)</sup> Naturwiss. 18, 303 (1936).

<sup>2)</sup> Helv. 14, 1370 (1931).

entspricht dem  $p_H$  des Eiklars) verdünnt, sorgfältig umgerührt und durch ein Jenaer Glasfilter G1 filtriert. Von dieser Grundlösung wurden jeweils  $8\text{ cm}^3$  mit der entsprechenden Salzlösung auf  $10\text{ cm}^3$  verdünnt und gemessen.

Fig. 25 gibt die Stärke der Strömungsdoppelbrechung in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration für einige Gradienten wieder.

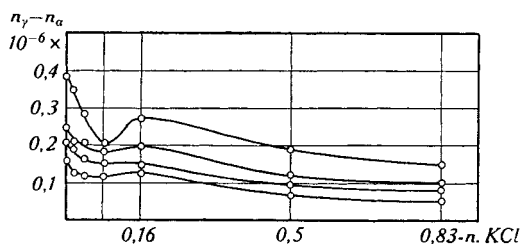


Fig. 25.

Strömungsdoppelbrechung einer Eiklarlösung in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration für die Gradienten: 7360, 4680, 3140, 1940.

Die Kurven zeigen ein deutliches, wenn auch nicht sehr hohes Maximum bei 0,16-n. KCl. Wenn man bedenkt, dass die Eiklarlösung selbst schon Salze enthält, so ist die effektive Salzkonzentration beim Maximum noch etwas höher als 0,16-n. Überraschend ist hier der verhältnismässig starke Einfluss des Salzes auf den Orientierungswinkel, wie er aus Tab. 12 hervorgeht.

Tabelle 12.

Orientierungswinkel bei Eiklarlösungen mit verschiedenen Kaliumchlorid-Zusätzen.

Salzkonz. Norm.	Gradient			
	1940	3140	4680	7360
0	80,1	81,1	81,6	82,1
0,16	78,2	76,9	76,1	75,8
0,83	77,5	76,9	76,2	75,3

Wir gehen indessen auf eine Diskussion desselben nicht ein, sondern geben in Fig. 26 nur noch den Verlauf von  $\eta_{\text{spez.}}$  bez. auf caseinfreie Salzlösung in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration wieder.

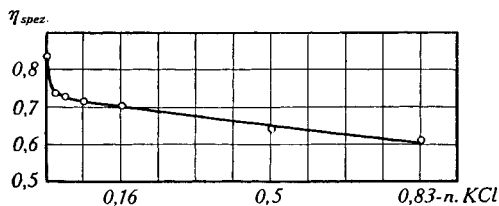


Fig. 26.

Einfluss von Kaliumchlorid auf die spez. Viskosität von Eiklarlösung.



Ebenso wie beim Casein ist auch hier bei der Viskosität nichts von Effekt C zu merken. Dagegen treffen wir wieder den steilen Abfall bei kleinen Salzzusätzen, der auf die Beseitigung des elektroviskosen Effektes zurückzuführen ist.

Als Resultat dieser Versuche soll lediglich festgehalten werden, dass Effekt C nicht spezifisch für das Casein ist, sondern auch bei anderen Proteinsystemen angetroffen wird, wodurch ihm jedenfalls eine erhöhte Bedeutung zukommt.

Im Folgenden berichten wir über Versuche, welche wir in der Vermutung anstellten, dass Effekt C mit der mizellaren Quellung der Caseinteilchen zusammenhängen könnte. Dabei interessierte uns zunächst die Frage, wie die Quellung von isoelektrischem Casein in Wasser durch Neutralsalze beeinflusst wird.

### 5. Der Einfluss von Neutralsalz auf die Quellung von isoelektrischem Casein.

Als Mass für das Quellungsvermögen benutzten wir das Sedimentationsvolumen, welches Caseinpulver nach Einstellung des Quellungsgleichgewichtes einnimmt. Dabei gingen wir folgendermassen vor:

In Reagensgläser von genau gleicher Weite (18 mm innerer Durchmesser) wurden je 0,5 g lufttrockenes Casein genau eingewogen, mit 10 cm<sup>3</sup> Alkohol übergossen und einige Zeit stehen gelassen. Dann wurde das Casein in der Handzentrifuge zum Absitzen gebracht, der Alkohol abgegossen und der Rest bei 40° verdunstet gelassen. Durch diese Vorbehandlung erreicht man, dass das Caseinpulver durch die wässrigen Salzlösungen leicht und vollständig benetzt wird. Die Caseinproben wurden nun mit je 15 cm<sup>3</sup> der entsprechenden Salzlösungen übergossen und während längerer Zeit mehrfach durchgerührt. Dann wurden die Gläser in genau senkrechter Stellung bei 0° stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurde die Höhe des Sediments in mm abgelesen. Bei noch längerer Wartezeit pflegt sich die Reihenfolge der Quellungsvolumina für die verschiedenen Proben nicht zu ändern.

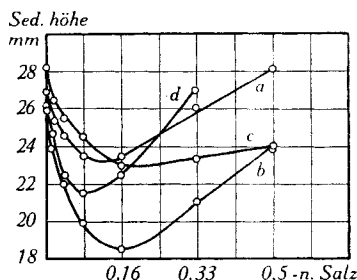


Fig. 27.

Quellungsvolumina von isoelektrischem Casein in Salzlösungen verschiedener Konzentration. Kurve a: KJ, Kurve b: KBr, Kurve c: KCl, Kurve d: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Trägt man die Sedimentationshöhen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration auf, wie dies in Fig. 27 geschehen ist, so zeigt sich, dass die Kurve jedes der untersuchten Salze ein sehr deutliches Minimum bei mittlerer Konzentration zeigt. Der Kurvenverlauf ist ohne weiteres reproduzierbar.

Da sonst alle Messungen bei 20°, diese aber, um Bakterienwachstum zu unterdrücken, bei 0° gemacht worden waren, überzeugten wir uns noch in einer 12 Stunden sedimentierenden Versuchsreihe, dass bei 20° der Einfluss von Kaliumchlorid — als Beispiel — auf die Quellung völlig analog wie bei 0° ist; die Kurve für 20° liegt nur eine Spur tiefer.

Die Tatsache, dass die Quellungsminima bei allen Salzen ungefähr bei der gleichen Konzentration liegen, wo Effekt C in den Strömungsdoppelbrechungskurven sein Maximum hat, lässt vermuten, dass hier ein ursächlicher Zusammenhang besteht. Allerdings könnte es sich auch um einen Zufall handeln, da das Quellungsminimum an isoelektrischem Casein, die Strömungsdoppelbrechung aber bei anionisch gelöstem Casein beobachtet worden ist. Wir versuchten deshalb, uns auch noch Aufschluss über den Einfluss der Salze auf den Hydratations- oder Quellungszustand der gelösten Caseinteilchen zu verschaffen.

#### 6. *Der Einfluss von Neutralsalz auf die Flockbarkeit von Natrium-caseinatlösung durch Nichtelektrolyte.*

Bei diesen Versuchen gingen wir von folgenden Überlegungen aus: Für die Stabilität wässriger Sole sind zwei Faktoren verantwortlich, einerseits die Ladung, andererseits die Hydratation der Teilchen. Bei manchen Proteinen genügt die Hydratation allein schon zur Dispersion, d. h. sie sind auch im isoelektrischen Punkt löslich. Hierher gehören die Albumine und die Gelatine. Bei vielen anderen Eiweissen müssen jedoch Hydratation und Ladung zusammenwirken, damit eine stabile Dispersion entsteht; zu ihnen gehören alle die, die im isoelektrischen Zustand in Wasser unlöslich sind, also beispielsweise auch das Casein. Beim Zufügen eines neutralen Salzes zu einer Lösung, welche geladene und hydratisierte Teilchen enthält, ist natürlich mit einer Beeinflussung beider Grössen zu rechnen. In unserem Falle, wo das Kolloid selbst ein Elektrolyt ist, kann Salzzusatz höchstens zu einer gewissen Veränderung der Grösse der Ladung, nicht aber zu einer völligen Entladung führen. Dies geht schon aus der Tatsache hervor, dass die von uns benutzten Salze auch in beliebig hoher Konzentration das Caseinatsol nicht zum Ausflocken bringen. Andererseits wird die Hydratation ebenfalls in einem gewissen Masse beeinflusst werden, und man kann erwarten, dass ein um so kleinerer Zusatz eines dehydratisierenden Nichtelektrolyten zur Erzielung einer Flockung nötig ist, je mehr die

Hydratation oder Quellung der Teilchen bereits durch Salz herabgesetzt worden ist. Es wurde deshalb so vorgegangen, dass wie früher mit jedem Salz eine Reihe von Lösungen hergestellt wurde, die alle die gleiche Caseinkonzentration, aber steigenden Salzgehalt aufwiesen. Die Lösungen — immer 5 cm<sup>3</sup> — wurden in kleinen Kölbchen unter Schütteln tropfenweise aus einer Bürette mit dem Nichtelektrolyten versetzt und dabei die Veränderungen visuell beobachtet. Es wurden immer zwei Punkte notiert:

1. Anzahl cm<sup>3</sup> des Fällungsmittels, die es braucht, um eine deutlich sichtbare Trübung zu erzeugen (in jeder Reihe Bezug auf eine Vergleichsprobe!).
2. Anzahl cm<sup>3</sup> bis zur ersten Flockenbildung.

Trotz dieser ziemlich primitiven Methodik waren die Werte recht gut reproduzierbar, so dass mindestens der Gesamtverlauf der Kurven als absolut reell angesehen werden kann.

In Vorversuchen waren verschiedene Nichtelektrolyte auf ihre Eignung für unsern Zweck geprüft worden. Bei den einwertigen Alkoholen nimmt die flockende Wirkung, wie auch *Jirgensons*<sup>1)</sup> gezeigt hat, mit dem Molekulargewicht zu. Die höheren Alkohole kommen bei ihrer geringen Wasserlöslichkeit nicht in Frage; am günstigsten erwies sich Propylalkohol. Auch Aceton ist sehr geeignet, da es mit Wasser mischbar ist und doch stark dehydratisierend wirkt. Die vollständig salzfreie Caseinatlösung ist mit diesen Nichtelektrolyten überhaupt nicht zur Koagulation zu bringen, da der Ladungsfaktor offenbar zu stark stabilisierend wirkt. Jedoch genügte bereits eine Salzkonzentration von 0,01-n., um die Ladung so weit zu neutralisieren, dass mit Propylalkohol oder Aceton eine Flockung erzielt werden konnte.

Die Werte für das Auftreten der ersten Flocken mit Propylalkohol sind in Fig. 28, die mit Aceton in Fig. 29 enthalten. Die Kurven, welche man beim Titrieren auf gleiche Trübung erhält, liegen etwas tiefer, sind aber sonst ganz ähnlich (siehe *H. Guggisberg*<sup>2)</sup>), so dass auf ihre Wiedergabe hier verzichtet wird.

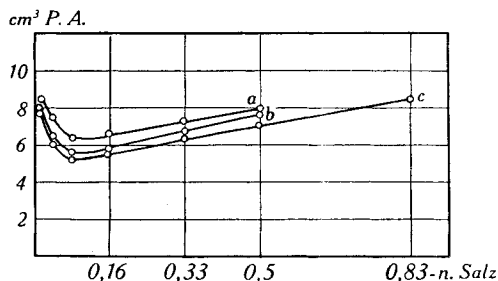


Fig. 28.

Koagulation 4-proz. Natriumcaseinatlösung mit Propylalkohol, beeinflusst durch Neutralsalz. Kurve a: KJ, Kurve b: KBr, Kurve c: KCl. Die Kurve für Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fehlt, da Propylalkohol bei einer Sulfatkonzentration von 0,16-n. aufwärts eine Ausscheidung von Salz bewirkt, bevor Casein ausflockt.

<sup>1)</sup> Koll.-ch. Beih. **44**, 285 (1936).

<sup>2)</sup> Diss. Bern 1940.

Bemerkenswert bei diesen beiden Diagrammen ist, dass alle Kurven durch ein Minimum gehen. Die Flockbarkeit der Natriumcaseinatlösung durch Nichtelektrolyte ist also bei mittleren Salzkonzentrationen am grössten. In der speziellen Form der Kurven kommt jedenfalls zweierlei zum Ausdruck:

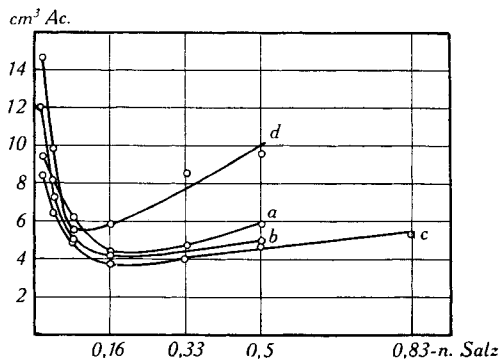


Fig. 29.

Koagulation 4-proz. Natriumcaseinatlösung mit Aceton, beeinflusst durch Neutralsalz.  
Kurven a, b, c: wie bei Fig. 28. Kurve d:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

1. Die Aktivität der Caseinanionen wird durch Salz vermindert, was einer teilweisen Entladung gleichkommt. Hierfür zeigen sich schon sehr kleine Salzkonzentrationen wirksam, was sich darin äussert, dass der abfallende Kurvenast links vom Minimum viel steiler verläuft als der aufsteigende rechts. Gleichzeitig wird auch der elektroviskose Effekt beseitigt.

2. Durch den Salzzusatz wird die Hydratationsquellung der Teilchen verändert. Sie zeigt, wie die Quellung von isoelektrischem Casein bei mittleren Salzkonzentrationen, ein Minimum und nimmt bei höheren Konzentrationen wieder zu. Ob diese Wiederzunahme mit einem Wiederanstieg der elektrischen Ladung der Teilchen zusammenhängt, kann auf Grund unserer Versuche nicht entschieden werden. Hierüber könnten Messungen der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit Auskunft geben.

Auf alle Fälle bleibt aber die Tatsache bestehen, dass bei ungefähr denselben Salzkonzentrationen die Quellung von festem Casein ein Minimum, die Flockbarkeit von gelöstem ein Maximum und Effekt C bei der Strömungsdoppelbrechung ebenfalls ein Maximum zeigen. Vergleiche hierzu die Zusammenstellung Tab. 13.

Die Annahme, dass die Wendepunkte in den Kurven, welche die Abhängigkeit der drei Grössen von der Salzkonzentration wiedergeben, auf denselben Umstand zurückzuführen sind, drängt sich geradezu auf. Es ist mindestens sehr wahrscheinlich, dass hier die Hydratationsquellung der Teilchen ein Minimum zeigt. Die von

uns untersuchten Salze wirken unspezifisch, d. h. ihre Wirkung auf den Quellungszustand ist nur qualitativ voneinander unterschieden.

Tabelle 13.

Salz	Salzkonzentration bei:			
	Effekt C maximal	Quellungs- minimum	Fällungsoptimum Aceton	Alkohol
KJ . . .	0,16	0,12	0,16	0,08
KBr . . .	0,16	0,16	0,16	0,08
KCl . . .	0,16	0,16	0,16	0,08
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . .	0,04	0,08	0,08	—

Unser Effekt C entspricht nur teilweise den *Bungenberg-Kruyt*-schen Vorstellungen über den Volumeneffekt. Der von uns ermittelte Volumeneffekt geht nur bei ganz kleinen Salzkonzentrationen parallel der Beseitigung des elektroviskosen Effektes; bei höheren Salzkonzentrationen ändert sich nur noch das Volumen. Auch haben jene Forscher nicht damit gerechnet, dass der Volumeneffekt durch ein Minimum gehen könnte.

Im ersten Moment scheint es schwierig, sich Volumenänderungen vorzustellen, die wohl die Stärke der Strömungsdoppelbrechung, nicht aber die Viskosität merklich beeinflussen. Es ist in der Tat auch nur möglich auf Grund der in dieser Arbeit entwickelten Vorstellungen über die Form der Caseinteilchen. Dieselbe ist langgestreckt mit einem Achsenverhältnis  $a/b \sim 10$ , vielleicht noch mehr. In diesen Stäbchen liegen die Peptidketten jedenfalls parallel der Längsachse orientiert, wofür vor allem die zitierten Arbeiten von *Polson* und *Neurath* sprechen. Diese parallel gepackten Peptidketten können sich nicht nur an der Oberfläche des Bündels hydratisieren, sondern auch im Inneren, was die Teilchen zu einer sich in verhältnismässig engen Grenzen haltenden Quellung befähigt. Es ist klar, dass diese Quellung ähnlich wie bei einer nativen Cellulosefaser nur eine Dicken-, nicht aber auch eine Längenzunahme der Partikel mit sich bringt, entsprechend folgendem Schema:

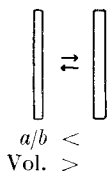


Fig. 30.

Wenn die Teilchen genügend grosses Achsenverhältnis aufweisen, so wird die Viskosität durch eine mässige Veränderung der Dicke nicht wesentlich verändert, wie man sich an Hand der Vis-

kositätsformeln (S. 583—584) leicht überzeugen kann, denn es nimmt z. B. bei der Entquellung wohl das Volumen ab, dafür aber das Achsenverhältnis zu. Mit andern Worten: Bei langen Teilchen ist für die Viskosität praktisch nur die Länge massgeblich, während die Dicke in gewissen Grenzen kaum einen Einfluss ausübt.

In unserm Falle ist der Einfluss jedenfalls so klein, dass ein Viskositätsminimum als Folge von Effekt C nicht zu bemerken ist. Andererseits ist eine Beeinflussung der Strömungsdoppelbrechung ( $n_z - n_x$ ) durch eine solche nur zweidimensionale Entquellung sehr wohl denkbar, denn:

1. nimmt die Dichte und damit der Brechungsindex der Teilchen zu, wodurch entsprechend der *Wiener'schen* Theorie der Anteil der Stäbchendoppelbrechung an der Gesamtdoppelbrechung zunehmen muss;

2. kann die Eigendoppelbrechung der Teilchen, die auf die Anisotropie der Polarisierbarkeit zurückzuführen ist, durch das Zusammenrücken der Peptidketten ebenfalls in einem gewissen Betrag erhöht werden.

Wir sind uns bewusst, dass gegen diese Interpretation von Effekt C Bedenken erhoben werden können. Was wir entwickelt haben, ist vorerst nur eine unbewiesene Theorie. Theorien haben aber dort ihre volle Berechtigung, wo eine exakte Analyse der Phänomene noch nicht möglich ist, nicht zuletzt deshalb, weil sie zur Kritik und zu neuer Fragestellung anregen.

Chemisches Institut der Universität Bern,  
Organische Abteilung.

## 74. Über die quantitative Mikrobestimmung des Kaliums im tierischen Gewebe

von I. Abelin.

(30. IV. 41.)

Zu den jüngeren Abschnitten der medizinischen Forschung gehört u. a. die Biochemie der Mineralbestandteile. Deren qualitativer Nachweis in biologischen Objekten gelingt gewöhnlich leicht, deren zuverlässige quantitative Bestimmung ist aber oft mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft. Zu diesen Bioelementen gehört auch das Kalium, das nach neueren Feststellungen an sehr vielen Stoffwechselvorgängen teilnimmt. Dementsprechend hat letzthin die Bestimmung des Kaliums in tierischen und pflanzlichen Säften sowie Geweben bedeutend an Interesse gewonnen. Die Zahl der dabei benutzten Verfahren ist recht gross. Sie beruhen grösstenteils auf