

11. Elektrochemisch-konstitutive Beziehungen bei Proteinen¹⁾

von Wolfgang Pauli.

(6. VII. 46.)

Die elektrochemischen Eigenschaften der einfachen Aminosäuren wurden sehr früh wegweisend für die Entwicklung der Elektrochemie der Eiweisskörper²⁾. Das galt zunächst für den Ampholytcharakter der Proteine, die Reaktions- und Umladungsfähigkeit mit Säuren und Laugen, und gipfelte schliesslich in der Übernahme der Lehre vom isoelektrischen Punkt sowie der zwitterionischen Konstitution von den einfachen Aminosäuren. Da der elektrochemische Aufbau der Oberfläche der Eiweissteilchen zugleich die wichtigen Wechselwirkungen derselben mit dem Lösungsmittel sowie mit Elektrolyten bestimmt, gewinnt die Kenntnis aller beim Übergange vom einfachen Modell der Aminosäure zum komplizierten Protein sich ergebenden Besonderheiten grosse Bedeutung. Auf einige anscheinend kaum beachtete Erfahrungen dieser Art und Möglichkeiten ihrer Deutung soll in den folgenden Ausführungen hingewiesen werden, für deren Gewinnung auf zwei Umstände Gewicht gelegt werden musste: 1. Die weitestgehende Reinigung der Eiweisslösungen von Elektrolyten als das Ausgangsmaterial; 2. die Einhaltung von Reaktionsbedingungen, welche eine ausreichende physikalisch-chemische Analyse gestatten, was z. B. die Verwendung von Pufferlösungen gänzlich ausschliesst.

Es hat schon *N. Bjerrum* in seiner grundlegenden Arbeit³⁾ gezeigt, dass wohl die aliphatischen Aminosäuren praktisch zur Gänze als Zwitterionen vorliegen, dass aber die aromatischen Aminosäuren neben der zwitterionischen Form ($-A^+$) in vergleichbarer Menge die undissoziierte Form (A^0) enthalten. Bei den Eiweisskörpern, deren Aufladung durch positive oder negative Ionenbildung vor allem jenen seitenständigen Amino-, bzw. Carboxylgruppen entstammt, die von in die Peptidkette eingebauten Diamino, bzw. Dicarbonsäuren herrühren, kann schon wegen der Ungleichheit ihrer Zahl und Stärke ein restloses Aufgehen derselben im zwitterionischen Aufbau nicht erwartet werden. Eine praktisch vollständige Erfassung der positiven und negativen Gruppen der Proteine ist auf dem Wege der potentiometrischen Titration, unter Einhaltung bestimmter Kautelen, möglich,

¹⁾ Nach Vorträgen gehalten in der Chem. Gesellschaft in Bern sowie im Kolloquium des physiologisch-chemischen Institutes der Universität Basel.

²⁾ Bezüglich des historischen Ganges siehe *Pauli-Valkeo*, Kolloidchemie der Eiweisskörper, 1933, Dresden-Leipzig.

³⁾ *N. Bjerrum*, Z. physikal. Ch. **104**, 147 (1923).

welche mit brauchbarer Näherung auch die Protonaufnahme, bzw. Abgabe im Überschuss von Säure oder Lauge zu bestimmen gestattet.

I.

Bei steigendem Zusatz starker Säure erfolgt die Protonaufnahme anfangs überwiegend durch Dissoziationszurückdrängung der Carboxylgruppen nach dem Schema $A' + H^+ \rightarrow A^0$, bzw. $-A^+ + H^+ \rightarrow {}^0A^+$, dann mit wachsender H^+ -Aktivität durch Überführung von Aminogruppen in die Ammoniumform nach $A^0 + H^+ \rightarrow A^+$, wobei sich die Reaktionstypen nicht scharf trennen, sondern überschneiden. Ähnliches gilt für die Protonabgabe auf Laugenzusatz, indem die Ammoniumgruppen des zwitterionischen Eiweiss in die Aminoform, bzw. undissoziierte Carboxyle unter Salzbildung in die ionische Form überführt werden. Zunächst seien zwecks Vergleiches zwei Beispiele¹⁾ vom Gang der Protonaufnahme (Säurebindung) bzw. Abgabe durch Laugenzusatz wiedergegeben. Darin bedeutet n^{III} die Normalität aufgenommenener oder abgegebener Protonen, also positiver bzw. negativer Proteinionen bei Zugabe von n HCl, bzw. n NaOH. Fig. 1 und Fig. 2.

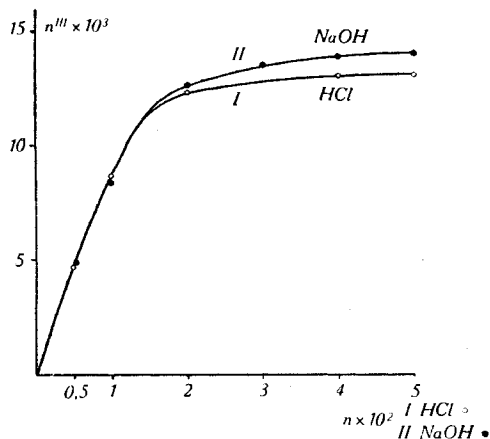


Fig. 1.
0,88% Seralbumin.

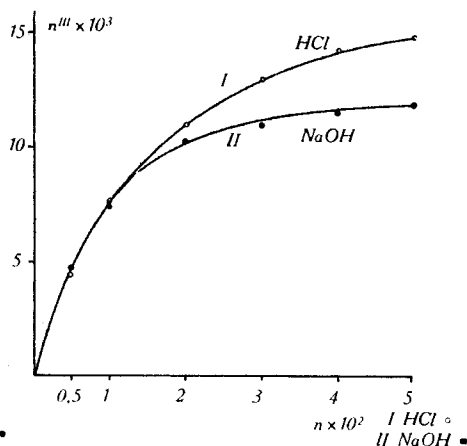


Fig. 2.
1% Pseudoglobulin.

Bei Seralbumin werden maximal mehr Protonen abgegeben, bei Pseudoglobulin können mehr aufgenommen werden als umgekehrt. Es ist also bei Seralbumin die Höchstzahl der negativen Gruppen grösser als die der positiven, bei Pseudoglobulin überwiegen die positiven Gruppen. Bei beiden Proteinen decken sich die Kurven der positiven und negativen Proteinionenbildung in weitem Anfangsbereich und verlaufen dort nahe geradlinig. Zunächst haben also zugefügte Säure und Lauge praktisch in gleichem Ausmass und in ihrem Hauptanteil protolytisch reagiert. Dann aber erfolgt rasch zunehmende Krümmung und geringer Anstieg der n^{III} -Kurve als Ausdruck des für den Rest der Protolyse und Aufladung nötigen Überschusses an Säure bzw. Base.

¹⁾ Pauli (mit F. Blank), Bioch. Z. **202**, 337 (1928).

Die folgende Tabelle I fasst einige Daten der wichtigsten Typen wasserlöslicher hochgereinigter Eiweisskörper auf Grund unserer älteren und neueren Messungen zusammen.

Sie enthält neben den Molekulargewichten¹⁾ die Höchstwerte von n^{III} , die daraus abgeleiteten maximalen Ladungszahlen je Eiweissteilchen Lz^+ und Lz^- , welche c.p. mit dem Mgw. wachsen, die Relation der negativen zu den positiven Gruppen, die isoelektrischen p_H -Werte I für 0,5-proz. Lösungen²⁾, sowie die Eigen-H⁺-Aktivitäten der zugehörigen elektrolytfreien Eiweisslösungen.

Tabelle I.

Protein	Mgw.	Max. Pro- tonaufn. je 1 g $n^{III} \times 10^5$	Max. Pro- tonabg. je 1 g $n^{III} \times 10^5$	Neg. Pos. Gr.	I	Eigen p_H	Lz^+	Lz^-
Ovalbumin	44000	110	134	1,22	4,6	4,74	48	59
Seralbumin	72000	148	159	1,08	4,99	5,34	103	110
Pseudoglob.	167000	148	126	0,9	6,00	5,79	247	213
Hämoglob.	69000	156	127	0,81	6,9	6,97	108	87

Ovalbumin und Seralbumin wären demnach entsprechend den Höchstzahlen von n^{III} mehr negative, Pseudoglobulin und Hb mehr positive Eiweisskörper. In der Tat findet sich auch ein gewisser Parallelismus im Gange der isoelektrischen Reaktion sowie der Eigen-H⁺-Aktivität mit dem Verhältnis der optimalen negativen (sauren) Gruppen der Eiweisskörper zu den positiven (basischen), indem sich I und Eigen- p_H mit relativer Zunahme der positiven Gruppe in Richtung zunehmender p_H -Werte verschieben. Dennoch bestehen hier wesentliche Divergenzen, die auch in bezug auf unsere späteren Ausführungen einige Beachtung verdienen. 1. Der isoelektrische Punkt und das Eigen- p_H liegen trotz Überwiegen von n^{III}_+ beim Pseudoglobulin (Psgl.) auf der sauren Seite und sind beim Hb höchstens neutral. 2. Trotz der sauren Eigenreaktion wandert Psgl. kathodisch, zeigt also eine positive Überschussladung.

Die Aufklärung dieser Diskrepanzen ergibt sich wohl aus der von uns schon vor Jahren festgestellten ausserordentlichen Reaktionsfähigkeit der hochgereinigten Eiweisslösungen mit CO₂ der Luft, die sich z. B. als stetiger Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit beim Stehen selbst im geschlossenen (nicht im verschmolzenen) Gefäss äussert. Zur Vollendung der Reinigung wird deshalb die Elektrodialyse unter N₂-Atmosphäre ausgeführt. Besonders ausgeprägt ist diese Empfindlichkeit bei Proteinen mit viel positiven Gruppen, ist jedoch auch beim stark sauren Ovalbumin sehr deutlich, welches beim elektrischen Überführungsversuch unter CO₂ sich wie alle anderen als einsinnig positiv aufgeladen erweist. Kohlensäure reagiert mit unseren Proteinen grundsätzlich

¹⁾ Vor allem nach den grundlegenden Messungen des osmotischen Druckes von G. Adair. Neuere Zusammenstellung vgl. H. Neurath, Cold Spring Harbor, Symp. on quantit. Biology VIII, 80 (1940).

²⁾ In 0,005-n. Acetat-Puffer.

wie jede andere Säure¹⁾. Beim Pseudoglobulin kommt es neben dem Eigen- $\alpha_{\text{H}} \sim 1 - 3 \times 10^{-6}$ zur Bildung positiver Gruppen mit Hydrogencarbonat als Gegenion, $\text{RNH}_3^+ + \text{HCO}_3^-$, und solche Gruppen überwiegen über den kleinen Anteil von $\text{RCOO}^- + \text{H}^+$ und bestimmen den Wanderungssinn der Teilchen. Eine geringe Zunahme der negativen Ladung mittels $3 \times 10^{-6} \text{ n. K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ genügte schon, um neben der kathodischen auch eine anodische Überführung merkbar zu machen²⁾, doch bedurfte es $9 \times 10^{-5} \text{ n. KOH}^3)$, um mit $\text{p}_{\text{H}} = 6$ isoelektrisches Verhalten herbeizuführen.

II.

Man darf weiter die Frage nach dem Ausmass der zwitterionischen Aufladung der Proteine stellen, deren Schätzung von den folgenden leitenden Gesichtspunkten aus versucht werden kann. Die basischen und sauren Anteile des Proteins lassen sich in zwei Hauptgruppen zusammenfassen. Die stärksten sauren oder basischen Gruppen werden die innere Salzbildung, das ist den zwitterionischen Aufbau besorgen, die schwachen sauren oder basischen Seitenglieder werden dann die zweite Hauptgruppe bilden, die a) aus einem sozusagen hydrolytischen Anteil des inneren Salzes und b) aus jenen verbleibenden überschüssigen sauren oder basischen Gruppen besteht, wie sie der Differenz maximaler Protonaufnahme und Abgabe entsprechen. Zur Salzbildung in der zweiten Hauptgruppe wird ein mehr oder minder grosser Überschuss von Säure oder Base erforderlich sein, ebenso zur etwaigen Trennung von durch innere Absättigung neutralisierten positiven und negativen Gruppen.

Ein Verfahren zur Trennung der zwei Hauptgruppen der sauren und basischen Seitenglieder und damit zur Feststellung des zwitterionischen Anteiles würde sich aus der Viskositätsbestimmung (η) ergeben. Der Vergleich der η -Kurve mit dem Verlauf der Protonaufnahme bei steigendem HCl-Zusatz lehrt, dass ihr Anstieg mit der steilen Zunahme der Aufladung (n^{III}) zusammengeht, ihr Abfall in das Gebiet des zunehmenden Säureüberschusses fällt. Das Optimum von η trifft nun, wie wiederholt bei früheren Gelegenheiten⁴⁾ gezeigt wurde, mit dem durch potentiometrische Bestimmung der Gegenionen (Cl') zu ermittelnden Aktivitätsmaximum derselben im Eiweissalz, sowie mit dem Optimum der auf das Proteinsalz entfallenden Leitfähigkeit κ^{III} zusammen. Als Beispiele seien ein Versuch am Hämoglobin⁵⁾ und an Gelatine⁶⁾ (Fig. 3) angeführt.

Vgl. Fig. 2, 1,96% Hb+HCl, Helv. **28**, 652 (1945).

¹⁾ Pauli und Th. Stenzinger, Bioch. Z. **205**, 71 (1929).

²⁾ Pauli und Takeo Ito, Bioch. Z. **213**, 95 (1929).

³⁾ Der Versuch war allerdings nicht mit genug weitgehendem Schutz gegen CO_2 durchgeführt.

⁴⁾ J. Frisch, Pauli und E. Valko, Bioch. Z. **164**, 401 (1925); K. Manabe und J. Matula, Bioch. Z. **52**, 369 (1913). Literatur Pauli-Valko l. c. Vgl. Pauli, Helv. **28**, 1426 (1945).

⁵⁾ Pauli u. W. Schwarzscher, Helv. **28**, 645 (1945).

⁶⁾ Pauli und H. Wit, Bioch. Z. **174**, 308 (1926).

Der Abfall von η zeigt also zugleich das Absinken der freien Ladung im einsetzenden Überschuss der Gegenionen an, entsprechend ihrer gesteigerten interionischen Wechselwirkung mit dem höherwertigen Proteinion unter zunehmender Inaktivierung und Anlagerung an dasselbe. Analoge Wirkungen auf α^{III} des Proteinsalzes.

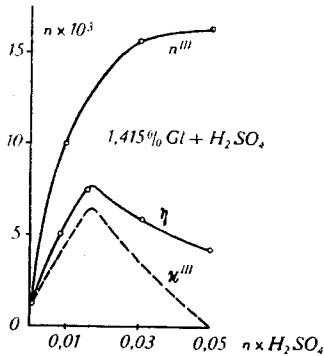


Fig. 3.
1,415% Gelatine + H_2SO_4 .

Die begleitende Zunahme von a_{H} geht nicht mit einem Eiweissabbau und entsprechendem η -Effekt einher, denn der Gegenionenüberschuss lässt sich mit gleicher Wirksamkeit auf η ohne a_{H} -Anstieg durch Neutralsalzzugabe erzielen. Die Lage des η - oder des Aktivitäts- oder des α^{III} -Optimums gibt uns also mit guter Näherung den Punkt der einsetzenden Überschusswirkung der Säure gemessen am Gegenion an. Die diesem Punkte korrespondierende Protonaufnahme oder ein-sinnige Proteinaufladung kann der n^{III} -Kurve unmittelbar entnommen werden.

Ein anderer Weg zu dem gleichen Ziele ergab sich bei der konduktometrischen Titration. Im Momente des einsetzenden H^+ -Überschusses erfolgt ein jäher Anstieg der Leitfähigkeit ehe noch die Sättigung des Proteins mit Proton, die maximale Säurebindung, erreicht ist. Die konduktometrische Titration gibt dann niedrigere Werte als die potentiometrische Bestimmung¹⁾. Die Daten der beiden Methoden sind also im allgemeinen nicht gleichwertig und zeigen verschiedene Grundwerte der Protonaufnahme an. Diese Verhältnisse sind schon wegen der grossen H^+ -Beweglichkeit bei der Titration mit starker Säure schärfer ausgeprägt als bei Lauge.

Die folgende Tabelle II gibt die dem Umschlagspunkt von η oder α korrespondierenden n^{III} -Werte wieder und den daraus abgeleiteten zwitterionischen Anteil der aufladenden Gruppen der Proteine.

¹⁾ Pauli und J. Safrin, Bioch. Z. **233**, 86 (1931).

Tabelle II.

Protein	Max. Proton- aufn. je 1 g potentiom. $n_{III} \times 10^5$	Max. Proton- abg. je 1 g potentiom. $n_{III} \times 10^5$	Protonaufn. konduktom. $n_{III} \times 10^5$	η -Optimum $n_{III} \times 10^5$	zwitter- ionisch %
Ovalbumin	110	134	64	68,6	$\frac{68,6}{110}$ 62%
Seralbumin	148	159	130	130	$\frac{130}{148}$ 88%
Pseudoglob.	148	126	94	92	$\frac{94}{126}$ 75%
Hämoglob.	156	127	—	126	$\frac{126}{127}$ 100%

Unter der plausiblen Annahme, dass praktisch nur die starken sauren und basischen, nicht aber die erst im Säure- oder Basenüberschuss protolytisch reagierenden Gruppen zur inneren Salz- bildung fähig sind, lässt sich ihr zwitterionischer Anteil berechnen. Dieser wäre mit 100 % zu bezeichnen, wenn das Maximum an korre- spondierenden oder äquivalenten positiven und negativen Gruppen durch innere Salz- bildung ionisiert ist. Da die Maxima von n_{III}^+ und von n_{III}^- verschiedener Grösse sind, bestimmt immer das kleinere von beiden den potentiellen 100 % zwitterionischen Aufladungsgrad, da sind bei Ovalbumin und Seralbumin die Höchstwerte von n_{III}^+ , bei Pseudoglobulin und Hb die optimalen Grössen von n_{III}^- . Das neutrale Hb hätte demnach 100 % seiner möglichen zwitterionischen Aufladung und da die nur spurenweise kationische Wanderung keinen erheblichen positiven Ladungsrest erkennen lässt, wären hier kaum Störungen der Teilchenassoziation durch elektrostatische Kräfte zu erwarten. Damit stünde die gute Krystallisierbarkeit mittels einfacher Abkühlung durchaus im Einklang. Die bisherigen Schätzungsverfahren der zwitterionischen Struktur von Proteinen beruhen auf Beobach- tungen der Volumenänderungen bei der Protolyse oder auf der diese begleitenden Wärmetönung. *H. H. Weber*¹⁾ kam so zur Annahme von 70—100 % zwitterionischem Aufbau, was mit unseren Ergebnissen in Übereinstimmung steht.

Man könnte bei Betrachtung des zwitterionischen Aufbaus die Frage aufwerfen, ob nicht die ionischen Gruppen so weit voneinander entfernt sind, dass die wechselseitige Beeinflussung ausserordentlich herabgesetzt wird oder ganz verschwindet. Da- gegen sprechen jedoch schon die Erfahrungen am einsinnig ionischen Protein. Bei Besei- tigung etwa der negativen Ladungen durch Dissoziationszurückdrängung mittels H^+ -Ionen würde der durchschnittliche Abstand der verbleibenden positiven Ladungen des Protein- ions nahe doppelt so gross, jedenfalls erheblich grösser wie bei der zwitterionischen Form. Dennoch wirkt das einsinnige Eiweission als vielwertiges Ion mit höherer Feldstärke, wie nicht nur die gesteigerte Inaktivierung und Anlagerung einwertiger Gegenionen,

¹⁾ *H. H. Weber*, *Bioch. Z.* **218**, 1 (1930).

sondern auch gewisse Kolloid-Kolloid-Reaktionen anzeigen. So genügt schon, um ein weniger geläufiges Beispiel¹⁾ anzuführen, das Durchströmen mit CO_2 , um mit dem negativen, durch ED und EDek hochgereinigten Kongoblausol eine Empfindlichkeitssteigerung der Flockung des durch die Kohlensäure elektropositivierten Albumins auf $0,1 \text{ } \mu/\text{cm}^3$ zu bewirken.

Das Zusammenwirken der entgegengesetzten Ionen beim zwitterionischen Eiweiss zeigt sich unmittelbar im folgenden Fall²⁾, bei dem die sehr empfindliche Messung der Ag-Aktivität Verwendung fand. Die durch die negativen Gruppen des Proteins inaktivierte Menge von Ag-Ionen aus zugesetztem AgNO_3 wird durch eine elektrostatische Gegenwirkung der positiven Gruppen vermindert. In der Reihenfolge Ovalbumin, Seralbumin, Gelatine wächst die Relation der Höchstwerte der beiden Gruppen $n_{\text{III}}^+/n_{\text{III}}^-$ wie 0,82: 0,92: 1,34. In der gleichen Ordnung nimmt die Menge der inaktivierten Ag-Ionen ab, wie Fig. 4 veranschaulicht.

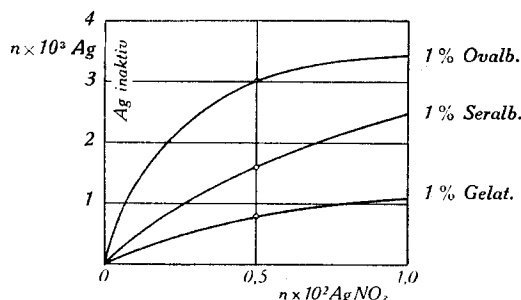


Fig. 4.

1% Ovalbumin, Seralbumin, Leimglutin + AgNO_3 .

Verwendet man an Stelle von AgNO_3 das Ag_2O (in Lösung AgOH), so wird infolge der Umwandlung der ionischen Ammonium- in undissoziierte Aminogruppen die von Seralbumin oder Leimglutin inaktivierte Ag-Menge aufs vier- bis fünffache gesteigert²⁾. Das Ovalbumin fällt sofort quantitativ aus.

Als bemerkenswerten Nebebefund liefert die potentiometrische Ag-Bestimmung mit Silberlange zugleich eine Kontrolle der unter ganz verschiedenen Bedingungen ermittelten Höchstwerte der negativen Gruppen von Seralbumin mittels NaOH , welche $159-160 \times 10^{-5} \text{ n je g Protein}^3)$ ergab. Die Inaktivierung von Ag aus AgOH führte zu $n_{\text{III}}^- = 159,8 \times 10^{-5}$, also jedenfalls zur Bestätigung des gleichen Wertes bei $a_{\text{OH}} = 1,5 \times 10^{-5} \text{ n}$ gegenüber der 1000-fachen Grössenordnung von $[\text{OH}^-]$ in Natronlauge, was nicht nur methodisch von grösstem Interesse ist, sondern auch im zweiten Falle gegen irgendeine merkliche Störung durch etwaigen Laugenabbau des Proteins im Bereiche der Versuchsbedingungen spricht.

¹⁾ Pauli und E. Weiss, Bioch. Z. **203**, 103 (1931); Pauli und L. Singer, ebenda **244**, 76 (1932).

²⁾ Ed. Goigner und Pauli, Bioch. Z. **235**, 271 (1931).

³⁾ Pauli (mit F. Blank), Bioch. Z. **202**, 373 (1928).

III.

Der Viskositätseffekt bei Überführung des Proteins in die einsinnig ionische Form hat den grossen Vorzug, nahezu rein die Änderungen in den Eigenschaften des Proteinions widerzuspiegeln. In der Tat bringt auch das nähere Studium desselben bemerkenswerte, bisher übersehene Hinweise auf elektrochemischkonstitutive Besonderheiten, durch welche sich die aufladenden positiven von den negativen Gruppen erheblich unterscheiden.

Betrachten wir zunächst die theoretischen Grundlagen der Viskositätsänderung, bei welcher der Anstieg von η zusammengeht mit der Zunahme der einsinnigen Aufladung, während der Abfall von η symbat mit der Abnahme der freien Ladung des Proteinions erfolgt. Für den η -Anstieg mit steigender Proteinionisation kommen vor allem zwei Möglichkeiten in Betracht: 1. Änderung der Hydratation, wobei vor allem eine solche der Hydratationstopik beim Übergang vom zwitterionischen zum einsinnig ionischen Aufbau anzunehmen ist. Die Zahl der Ionen wäre dabei wenig geändert, nur treten an Stelle der fixen die freien Gegenionen, z. B. Cl' . Energetisch erscheint der Unterschied nicht erheblich¹⁾; er liegt vor allem in der Anordnung von einerseits anliegenden zwitterionischen, anderseits weiterreichenden einsinnig ionischen Solvathüllen. Das Bild wäre analog der Verteilung der magnetischen Kraftlinien zwischen entgegengesetzten und zwischen gleichnamigen Magnetpolen, wobei durch Eisenfeile die Dipole im Felde veranschaulicht werden können. 2. *K. H. Meyer* und *H. Mark*²⁾ heben die Rolle der Gestaltänderung hervor durch eine infolge der intraionischen Abstossung eintretende Streckung der Hauptvalenzketten. Der elektrostatische Streckungseffekt gilt jedoch vor allem für reine Linearkolloide. Bei den kugelförmigen oder rotationsellipsoiden Proteinen liegen keine einfachen Hauptvalenzketten, sondern Assoziate von solchen vor. Die Anpassung der Theorie erfolgte dann durch *G. Ettisch* und *G. Schulz*³⁾ mit der Annahme einer Auseinanderspreizung der Teile unter Bestehen von einzelnen Stellen, die verbunden bleiben. Das wären also Lockeraggregate mit Einschluss von blockiertem Wasser, damit verbunden eine starke Volumvermehrung der Teilchen mit zugehörigem η -Anstieg.

Das Studium der protolytischen Änderungen des Hämoglobin gab in der Tat Anhaltspunkte dafür, dass zwei Mechanismen des η -

¹⁾ Die Bestimmung der Hydratation mittels des nichtlösenden Raumes würde die für die Viskosität massgebenden Umstände nicht genügend zum Ausdruck bringen. *N. Riehl* (Z. physiol. Ch. **281**, 73 (1944)) kommt zu dem Ergebnis, dass der nichtlösende Raum nur das eingeschlossene und nicht das oberflächliche Hydratwasser der Proteine anzeigt.

²⁾ *K. H. Meyer* und *H. Mark*, Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe. Leipzig 1930.

³⁾ *G. Ettisch* und *G. Schulz*, Bioch. Z. **239**, 48 (1931).

Anstieges bestehen, die voneinander getrennt werden können. Einen Beleg dafür bildet der Gang von η bei 1,84% Hb und steigendem Zusatz von HCl, bzw. LiOH bezogen auf n_{III}^{III} , die Aufladung der Proteinionen nach Versuchen mit W. Schwarzacher¹⁾.

Vgl. Fig. 4, Helv. **28**, 651 (1945), 1,84% Hb + HCl bzw. LiOH.

Diesem Versuch ist zu entnehmen, dass mit zunehmender Protonaufnahme ein kritischer Schwellenwert von n_{III}^{+} und zugehöriger Teilchenladung $Lz^{+} \sim 26$, also nahe $\frac{1}{4}$ der positiven Höchstladung auftritt, bei dem nach einem anfänglichen sanften Anstieg eine steile Erhebung von η erfolgt, wobei der Neigungswinkel von 27° auf 70° hinaufschnellt. Auch bei Laugenzusatz, also negativem Hb-ion tritt ein solcher kritischer Umschlag von η aber erst bei $Lz^{-} \sim 47$, also nahe $\frac{1}{2}$ der höchsten negativen Hb-Ladung ein. Es liegt nun nahe, den kritischen Übergang zum jähen η -Anstieg mit dem Einsetzen der intraionisch bedingten Auseinanderspreizung der Teilchen in Zusammenhang zu bringen, bei der eine gewisse Assoziationsenergie zu überwinden ist. Da Punkte gleicher Wertigkeit oder Aufladung des gleichen Proteins verglichen werden, würde man, unabhängig vom Vorzeichen der Ladung, Übereinstimmung von Feldstärke, Ionen-volum, Hydratation und intraionischem Spreizeffekt erwarten, was jedoch in auffallendem Ausmasse nicht zutrifft.

Ähnliches gilt am 1-proz. Seralbumin.

Vgl. Fig. 6, Helv. **28**, 660 (1945), 1-proz. Seralbumin, HCl bzw. NaOH.

Auch hier finden sich zweierlei kritische Punkte für den η -Umschlag, und zwar bei $Lz^{+} 12$ für das positive und $Lz^{-} 49$ für das negative Albumin. Sehr beachtenswert ist der Vergleich mit dem Gange der spezifischen Drehung²⁾ $[\alpha]_D$, welche zum Unterschiede vom anfänglichen mässigen Anstieg der η -Werte erst mit Einsetzen des steilen η auch eine kritische Erhöhung aufweist, die dann für die positiven bzw. negativen Eiweissionen an den gleichen, so stark auseinander liegenden n_{III}^{III} -Werten erfolgt wie der η -Umschlag. Das würde der Möglichkeit entsprechen, dass erst mit der Auseinanderspreizung auch jene die optische Änderung tragenden Anteile des Proteins der Reaktion zugänglich oder fähig werden. Von grösstem Interesse erscheint auch beim Seralbumin die Feststellung, dass eine so bedeutende Differenz in den Ionen gleicher Ladung derselben Eiweissmolekel hervortritt je nach dem die positiven oder negativen Gruppen die Aufladung vermitteln.

¹⁾ Pauli und W. Schwarzacher, Helv. **28**, 645 (1945).

²⁾ Die ersten Beobachtungen solcher Art erschienen 1910 (Pauli und M. Samec, Akad. Anz. Wien **17**, 1910; Pauli, M. Samec, E. Strauss, Bioch. Z. **59**, 470 (1914)). Spätere Literatur bei Pauli-Falko, Kolloidch. d. Eiweissk., I. c. Die obigen Versuche Pauli und W. Kölbl, Koll. Beih. **41**, 417 (1935). Ferner neuere Daten Pauli, Helv. **28**, 1426 (1945).

Auch im Abfall des η nach Überschreiten des Optimums, der den Gang der Aktivität im Gegenionen-Überschuss anzeigt, kommt der Unterschied der positiven und negativen Proteinionen hervor in dem viel steileren Abstieg bei den positiven Proteinionen, was auf eine geringere Inaktivierung der Gegenionen beim negativen Eiweission¹⁾ hinweisen würde. Die kleine Tabelle III enthält für Säure- und Laugenzusatz die Differenzen der η -Werte im Optimum und in 0,05-n. des Zusatzes als $\Delta\eta \times 10^3$.

Tabelle III.

Protein	$\Delta\eta \times 10^3$	
	HCl	NaOH
0,88% Seralbumin	176	34
1% Pseudoglob.	182	12
2,37% Hämoglob.	52	5

Nach den angeführten Erfahrungen würde sich ergeben, dass die positiven Proteinionen schon mit weit kleinerer Aufladung in bezug auf den intraionischen Effekt wirksam werden und auch bezüglich der Ausgiebigkeit desselben den korrespondierenden negativen Proteinionen überlegen sind.

Ein anderes Gebiet mit verwandten Divergenzen an Proteinionen entgegengesetzter Ladung bei gleicher Wertigkeit bildet deren Wanderungsgeschwindigkeit (Wg.) im elektrischen Felde. Zu deren Bestimmung bei Kolloidionen, die in unserem Falle unabhängig von der Übersichtungsflüssigkeit sein muss, diente eine besondere Anordnung und Apparatur²⁾. Die Versuche³⁾ lehren, dass unter vergleichbaren Verhältnissen, also im Anfangsteil der Protonaufnahme oder -abgabe ausnahmslos die positiven Proteinionen schneller wandern als die negativen. Das gilt ebenso für Ovalbumin wie für Seralbumin und Pseudoglobulin.

Die Figuren 5, 6 und 7 geben die entsprechenden Daten bezogen auf n^{III} wieder. Die Protolyse erfolgte mittels HCl bzw. NaOH.

Die höheren η -Werte der positiven Seralbumin- und Pseudoglobulinionen machen sich somit nicht als geringere Wg. bemerkbar. Grössenunterschiede der Teilchen oder Differenzen in der Gesamtladung scheiden für die c. p. höhere Wg. der positiven Eiweissionen gegenüber den negativen als Erklärung aus.

¹⁾ Einer ähnlichen Deutung, nämlich der stärkeren Inaktivierung negativer Gegenionen zugesetzten 1,1-wertigen und 2,2-wertigen Neutralsalzes, durch die positiven Gruppen des Proteins, würden auch die folgenden Erfahrungen (*Pauli und Th. Stenzinger* l. c.) entsprechen. CaSO_4 verstärkt die anodische Wanderung von Seralbumin und unterdrückt die kathodische von Psg und Hb. Ebenso wird die einsinnige kathodische Wanderung des Psg durch 0,05-n. KCl in eine doppelsinnige verwandelt (*T. Ito und Pauli* l. c.).

²⁾ *L. Engel und Pauli*, Z. physikal. Ch. **126**, 247 (1927).

³⁾ *P. König und Pauli*, Bioch. Z. **252**, 325 (1932).

Was jedoch konstitutiv in die Augen fällt, sind die Unterschiede in der Länge der Seitenketten, welche die aufladenden Amino-, bzw. Carboxylgruppen tragen. Die Diaminosäuren Arginin und Lysin haben 8,8 Å und 7,8 Å. Histidin wäre gleichfalls um 8 Å zu setzen.

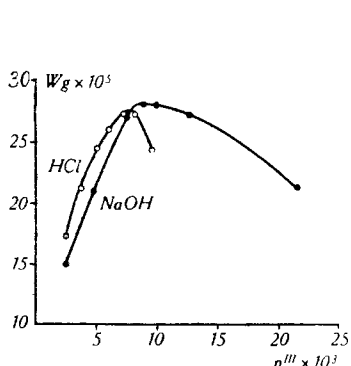


Fig. 5.
1% Ovalbumin

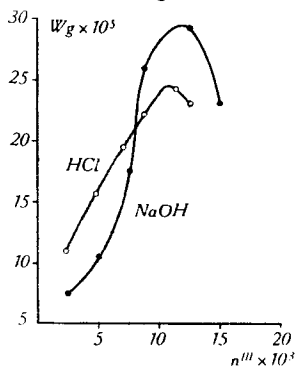


Fig. 6.
1% Serumalbumin

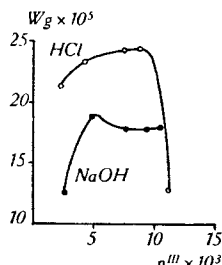


Fig. 7.
1% Pseudoglobulin

Hingegen sind die Längen der Asparaginsäure und Glutaminsäure 3,8 Å und 5,1 Å. Kürzere Seitenketten der Dicarbonsäuren könnten nicht nur bedeuten, dass die negative Ladung relativ nach innen verlegt ist, sondern, dass sie auch weniger verschieblich ist, während die positive Ladung mehr in das Medium hineinragt. Es können aber auch die kürzeren, ionisierten Seitenketten durch benachbarte nicht-ionische lipophile oder anhydrophile leichter eingeschlossen oder abgeschirmt werden, z. B. von Leucin mit der Kettenlänge von ca. 6 Å.

Die hervorgehobenen konstitutiven Verschiedenheiten betreffend die positiven und negativen Gruppen im Eiweiss, die offenbar in analoger Weise z. B. bei der deutlich stärkeren Hemmung der Hitze- und Alkoholkoagulierbarkeit durch kleinere Zusätze von Säure verglichen mit Lauge hervortreten, rücken noch auf einem anderen Gebiete offenbar verwandter Problematik in den Vordergrund, in der Frage nach den Bedingungen der Wasserlöslichkeit elektrolytfreier Proteine.

IV.

Die Frage der Wasserlöslichkeit reiner Proteine drängte sich beim Vergleiche von Untersuchungen an den Albuminen einerseits¹⁾ und an Casein und Edestin²⁾ anderseits auf. Die allgemeine Bedingung der Wasserlöslichkeit lautet, dass die Hydratationsenergie grösser sein muss als die Assoziationsenergie (Gitterenergie) der Molekel. In der Eiweissmolekel sind nur beschränkte Gruppen einer genügenden Hydratation fähig. Ihre Zahl und Anordnung, sowie das Ausmass ihrer Hydratation werden die Wasserlöslichkeit bestimmen.

¹⁾ Pauli und W. Kölbl, Koll. Beih. **41**, 417 (1935); Pauli-Valko l. c.

²⁾ Pauli und L. Hofmann, Koll. Beih. **42**, 34 (1935).

Die Peptidbindungen dürften geringe oder keine Hydratation aufweisen. Ein Unterschied derselben ist bei löslichen und unlöslichen Proteinen nicht zu finden. *D. Jordan-Lloyd* und *H. Phillips*¹⁾ nehmen zur Erklärung der fehlenden Hydratation Ringschluss durch Brücken-H zwischen O und N der Peptidbindung an. Hydroxylgruppen (Tyrosin, Oxyprolin, Serin) gehören nur zu einem geringen Bruchteil der Aminosäuren. Tyrosin verteilt sich gleichmässig auf lösliche und unlösliche Proteine. So bleiben hauptsächlich die ionischen hydratisierten Gruppen als Grundlage der Wasserlöslichkeit übrig, wie sie auch für die Alkali-, Säure- und die Neutralsalzlöslichkeit der Proteine massgebend sind. Sie müssen frei und in genügender Zahl vorhanden sein. Im reinen Protein werden vor allem Arginin und Lysin (Histidin mit seiner Iminogruppe dürfte wohl vollständig erst mit Säurezusatz reagieren) und anderseits Asparagin- und Glutaminsäure in Betracht kommen. Phenolische Gruppen reagieren erst bei höherem Laugenzusatz protolytisch.

Die Tabelle IV bringt die zugehörigen Daten²⁾ für Casein und Edestin.

Tabelle IV.

	Casein		Edestin	
	Gewichts- proz.	g Mol $\times 10^3$ in 100 g	Gewichts- proz.	g Mol $\times 10^3$ in 100 g
a) Arginin . . .	5,0	21,5	15,8	90,8
b) Lysin . . .	6,0	42,81	2,2	15,06
c) Histidin . . .	2,6	16,76	2,1	13,55
a + b	11,0	64,31	18,0	105,86
d) Asparaginsäure	1,8	14,14	10,2	83,9
e) Glutaminsäure	22,0	150,0	19,0	129
d + e	23,8	164,14	29,2	212,9
d + e				
a + b	2,3	2,55	1,6	2,0

Betrachten wir zunächst das Casein, so zeigt dieses ein starkes Überwiegen der Dicarbonsäuren. Da Casein wasserunlöslich ist, müssen die überschüssigen COOH praktisch undissoziiert sein, wie etwa bei den höheren Fettsäuren, die allein (ohne Peptisator) nicht einmal

¹⁾ *D. J. Lloyd* und *H. Phillips*, Trans. Faraday Soc. **29**, 132 (1933).

²⁾ Die Daten dieses Abschnittes sind, wo keine besonderen Hinweise angeführt, vor allem den Zusammenstellungen von *E. Abderhalden* (Lehrb. d. physiol. Ch. 6. Aufl.) und *E. Waldschmidt-Leitz* (Neuere Untersuchungen über den Aufbau der Eiweisskörper, Leipzig 1931) entnommen. Vgl. auch *Pauli-Valko* l. c. Da die Analysen meist nur bis etwa 90% an Aminosäuren der Eiweisskörper erfassen, handelt es sich um Näherungswerte, die jedoch für die Ableitung der vergleichenden allgemeinen Beziehungen praktisch ausreichen, soweit sich dieselben auf genügend grosse und an verschiedenartigen Beispielen gegenseitig gut ergänzende Unterschiede stützen.

Hydrosole zu bilden vermögen. Einen extremen Fall stellt hier das wasserunlösliche Gliadin dar mit 52 % Dicarbonsäuren gegen nur 5,5 % Diaminosäuren, welche praktisch gegenüber den Dicarbonsäuren ganz zurücktreten. Beim Casein wären soweit positive Gruppen vorhanden, dass sie für eine zwitterionische Aufladung vom Ausmass des Ovalbumins ausreichen könnten. Die wahrscheinlichste Erklärung des Tatbestandes scheint uns die folgende: Wenn bei einem wasserunlöslichen Protein seitenständige positive und negative Gruppen in erheblicher Zahl vorliegen, hat eine fast vollständige innere Absättigung und damit Dehydratation derselben stattgefunden.

Womöglich noch deutlicher werden die Verhältnisse beim Edestin. Hier ist die Zahl der positiven Gruppen um 30 %, der negativen um 25 % höher als bei Casein. Die Summe der Diaminosäuren ist bei Edestin nahe gleich jener beim Seralbumin. Es könnte also mit dessen zwitterionischer Aufladung ein sehr wasserlösliches inneres Salz darstellen. Auch beim Edestin erscheint die Wasserunlöslichkeit nur durch die innere Absättigung der zwitterionischen Ladungen verständlich.

Arginin und Lysin (sowie Histidin) sind mit ihren langen Ketten für innere Absättigung günstig. Von den Dicarbonsäuren ist die längere Glutaminsäure (5 Å) dafür geeigneter als die kurze Asparaginsäure. Im gleichen Sinne spricht der röntgenographische Befund¹⁾. Asparaginsäure erscheint im Krystall zwitterionisch gestreckt. Die längere Glutaminsäure bildet ringähnliche Molekel, die innermolekular abgesättigt sind. Bei Casein und Edestin findet sich das mehrfache an Glutaminsäure, bei Gliadin 5mal so viel als bei den wasserlöslichen Albuminen. Hingegen steuert die kürzere Asparaginsäure bei Edestin nur wenig mehr als die Hälfte, bei Casein weniger als $\frac{1}{12}$, bei Zein $\frac{1}{16}$, bei Gliadin $\frac{1}{90}$ der Dicarbonsäuren bei. Einen besonderen Typus bildet das wasserunlösliche Seidenfibroin, da es überhaupt verschwindend wenig Diamino- und Dicarbonsäuren enthält, also keine Grundlage für die Bildung ionischer hydratisierbarer Gruppen besitzt.

Auf die Möglichkeit der teilweisen Abdeckung saurer Gruppen durch Amidstickstoff wurde von *E. J. Cohn*²⁾ hingewiesen. In diesem Zusammenhange ist von Interesse, dass gerade bei Casein mittels hydrolytischem Abbau die Amide Glutamin und Asparagin von *Posternak*³⁾ gefunden wurden. Beim Edestin konnte mittels fermentativer Spaltung Asparagin direkt, Glutamin indirekt von *Damodaran*⁴⁾ nachgewiesen werden.

Im Sinne unserer Auffassung müsste also für die wasserlöslichen Proteine die Fragestellung lauten: Durch welche Um-

¹⁾ *J. Hengstenberg* und *F. V. Lenel*, Z. Kr. **77**, 424 (1931); *J. D. Bernal*, ebenda **78**, 363 (1931).

²⁾ *E. J. Cohn*, Erg. Physiol. **33**, 78 (1931).

³⁾ *S. Posternak*, C.r. **186**, 1762 (1928).

⁴⁾ *M. Damodaran*, Bioch. J. **26**, 235 (1932).

stände wird bei diesen Proteinen die innere Absättigung verhindert?

K. H. Meyer und *H. Mark*¹⁾ haben die Bedeutung der Relation der lipophilen zu den hydrophilen Anteilen für die Wasserlöslichkeit der Proteine hervorgehoben. Allerdings liegen hier die Verhältnisse nicht so einfach wie die nähere Prüfung zeigt. Dass die lipophilen die Alkohollöslichkeit gegenüber der Wasserlöslichkeit begünstigen, lehren die Versuche von *St. v. Przylecki* und *M. Grynberg*²⁾, welche die Wichtigkeit der obigen Relation für die Anreicherung von Proteinen an der Grenzfläche organischer Lösungsmittel und Wasser am Beispiel von Ovalbumin und Gelatine aufzeigten. Wir möchten jedoch auf eine besondere Funktionsmöglichkeit lipophiler Gruppen hinweisen, welche sich indirekt im Sinne einer Begünstigung der Wasserlöslichkeit auswirkt, nämlich die räumliche Behinderung einer inneren Absättigung entgegengesetzter ionischer Gruppen durch zwischengelagerte, geeignete anhydrophile Gruppen. Seralbumin und Lactalbumin haben etwa 30 % Leucin, Globin, das dem Hb die Wasserlöslichkeit verleiht, weist 29 % Leucin auf. Hingegen enthalten Casein und Edestin nur 10 % bzw. 14,5 % und das gleichfalls unlösliche Gliadin 7 % Leucin. Leucin ist die längste in Proteinen vorkommende kettenförmige Monoaminosäure und anhydrophil. Zumal mit dem endständigen doppelten Methylzweig erscheint es besonders geeignet zur Abschirmung zwischenliegender, ionischer, insbesondere der kürzeren seitenständigen Carboxylgruppen.

Zein mit 25 % Leucin bildet da nur eine scheinbare Ausnahme, indem hier 31,3 % Glutaminsäure und 1,6 % Asparaginsäure nur 1,6 % Diaminosäuren, also $\frac{1}{20}$ gegenüberstehen. Damit ist eine ausreichende zwitterionische Aufladung nicht möglich. Dagegen finden sich hier, wohl im Zusammenhange mit dem hohen Leucingehalt, bemerkenswerte Löslichkeitsverhältnisse in Alkoholmischungen, die von *G. Galeotti* und *G. Giampalmo*³⁾ näher untersucht wurden.

Bei der gründlich von *H. D. Dakin* analysierten Gelatine sind alle Besonderheiten gut zu übersehen. Es scheint wenig beachtet, dass eine durch ED hochgereinigte Gelatine z. B. in 2-proz. Lösung, bei Zimmertemperatur vollständig ausflockt. Da sie bei 15 % Diamino- und 9,2 % Dicarbonsäuren nur 7,1 % Leucin enthält, wären die Bedingungen für innere Absättigung gegeben. Die Peptidketten bestehen sonst zu etwa 75 % aus einfachen Aminosäuren, unter denen neben Prolin mit 9,5 % das Oxyprolin mit 14,1 % auffallend stark hervortritt. Die OH-Gruppen des letzteren sind jedenfalls für die Wasserlöslichkeit nicht ausreichend. Von Interesse ist bei dieser Gelatine die Bedeutung von Erwärmen oder kleiner Mengen von Neutralsalz für die klare Zerteilung. Die innerionische Absättigung wird hier

¹⁾ *K. H. Meyer* und *H. Mark*, Aufbau d. hochpolym. organ. Naturstoffe, Leipzig 1930.

²⁾ *St. v. Przylecki* und *M. Grynberg*, Bioch. Z. **248**, 16; **256**, 75 (1932).

³⁾ *G. Galeotti* und *G. Giampalmo*, Koll. Z. **3**, 118 (1908).

anscheinend durch die Biegung und Spannung der langen Zwischenglieder labil und schon durch gesteigerte thermische Bewegung oder interionische Wechselwirkung mit Salzionen geschwächt, bzw. aufgehoben.

Die zur Lösung der gleichen Menge wasserunlöslichen Proteins nötige Salzmenge wird von der Zahl seiner zwitterionischen Aufladungen und von der inneren Absättigungsenergie derselben wesentlich abhängen. Bei den sehr sauren unlöslichen Proteinen Gliadin, Casein, Edestin nimmt in dieser Folge die Salzlöslichkeit mit dem wachsenden Anteil basischer Gruppen, also dem potentiellen zwitterionischen Aufbau zu. In derselben Ordnung wächst auch deutlich der Leucingehalt, 7:10:14,6. Beim letzten Glied der Reihe, dem Edestin, hat ferner der Anteil an der viel kürzeren Asparaginsäure zugenommen, was zugleich die innerionische Absättigung schwächen muss. Bei der Gegenwirkung von Salzionen auf die innerionische Absättigung kommt es zur Ausbildung eines besonderen Typus der *Debye*'schen Ionenatmosphäre, indem mit den in relativ festen Abständen fixierten Zwitterionen eine alternativ gebaute äussere Gegenionenwolke entsprechend einem periodischen Wechsel der äusseren Gegenionen korrespondiert.

Im Zusammenhang mit der angenommenen Funktion der Kettenlänge und des Abstandes der aufladenden ionischen Gruppen des Proteins, sowie der Rolle geeigneter benachbarter anhydrophiler Seitenketten bei der Abschirmung dürften auch die angeführten Beobachtungen stehen betreffend den Unterschied der positiven und negativen Gruppen beim intraionischen Abstossungseffekt und dessen Wirkung auf η . Er tritt viel früher und ausgiebiger bei den positiven verglichen mit den negativen ein, zugleich aber ist die Wirkung im Überschuss der Säure also der Gegenionen als Abnahme der freien Ladung und damit des η viel ausgeprägter als bei Lauge. Im letzteren Falle sinkt die η -Kurve viel flacher aus dem Optimum ab.

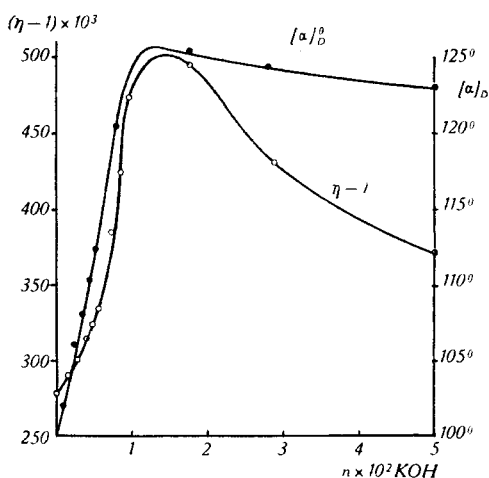


Fig. 8.

Ganz abweichend davon zeigt das Caseinat mit steigendem Laugenzusatz eine η -Kurve, die mit ihrem steilen Anstieg sowie

starkem Abfall von η auffallend ähnlich ist den Kurven von Säurealbumin. Ein solcher η -Abfall wäre beim Caseinat ein Ausdruck der erhöhten Inaktivierung im Überschuss der Alkaligenionen.

Fig. 8 gibt (nach Versuchen mit *L. Hofmann* l. c.) den Gang von η und $[\alpha]_D$ bei 1% Caseinat+NaOH wieder.

Die nähere Betrachtung lehrt, dass beim Caseinat mit der Aufhebung der innerionischen Absättigung durch den Laugenzusatz, bzw. durch Einsetzen der Ionisation an den überschüssigen Carboxylen sich ein verwandtes Bild in der topischen Anordnung der aufladenden Gruppen mit derjenigen der positiven Gruppen des Säurealbumins einstellt. In diesem Sinne kann dann nämlich im Casein das 12-fache Überwiegen der längeren Glutaminsäure unter den Dicarbonsäuren sowie der geringe Leucingehalt, die beiden verschiedenen Fälle angleichend, wirksam werden.

V.

Bei früheren¹⁾ Gelegenheiten war bereits auf die bedeutenden Abweichungen hingewiesen worden, welche am Verhalten der Proteine im isoelektrischen Gebiet gegenüber den einfachen Ampholyten hervortreten und die Ungültigkeit charakteristischer, für die letzteren abgeleiteten Gesetzmässigkeiten (*L. Michaelis*, *S. P. L. Sørensen*) bei den Eiweisskörpern zur Folge haben. Abschliessend mögend hier noch einige zugehörige Ergänzungen zur Elektrochemie reiner, elektrolytfreier Eiweisslösungen angeführt werden.

Durch Elektrodialyse in N_2 -Atmosphäre lassen sich in diesen Lösungen befriedigend reproduzierbare a_H - und κ -Werte²⁾ gewinnen. Fig. 9 gibt ein Bild des Ganges der H^+ -Aktivität bei Ovalbumin, Serumalbumin und Pseudoglobulin mit der Konzentration wieder.

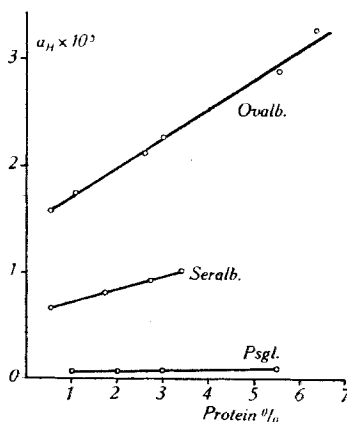


Fig. 9.

¹⁾ *Pauli*, Koll. Z. **40**, 185 (1926); **53**, 51 (1930).

²⁾ *D. v. Klobusitzky* und *Pauli*, Bioch. Z. **260**, 201 (1933).

Ovalbumin ist das stärkste saure Protein dieser Gruppe und zeigt den steilsten Anstieg von a_H mit der Konzentration. Die H^+ -Aktivität $2,5 \times 10^{-5}$ -n. ($p_H = 4,6$), welche dem isoelektrischen Punkt von 0,5 % in Acetat-Puffer¹⁾ entspricht, wird in 4-proz. Lösung erreicht. In 6,33 % Ovalbumin betrug $a_H = 3,36 \times 10^{-5}$ -n. ($p_H = 4,47$). Bei diesem sauren Protein gilt also das für einfache Ampholyte abgeleitete Gesetz von *Sørensen* nicht, dass der Grenzwert des mit der Konzentration ansteigenden a_H zugleich den isoelektrischen Punkt wiedergibt. Setzt man z. B. HCl in kleinen Mengen (10^{-4} bis 10^{-3} -n.) zu Ovalbumin, so lässt sich zeigen²⁾, dass im Bereich der niedersten Zusätze praktisch das ganze zugefügte H^+ gebunden wird, wobei a_H sich nur sehr wenig (um einige Prozente) über die Eigen- H^+ -Aktivität der Eiweisslösung erhebt, während Cl praktisch frei bleibt. Das würde besagen, dass hier ganz im Sinne von *Sørensen* im isoelektrischen Punkt gelten wird: $A^+ + H^+ = A^+ + Cl^-$ oder dass zur Herbeiführung isoelektrischen Verhaltens nahe die der Eigen- H^+ -Aktivität des Albumins entsprechende Menge HCl zugesetzt werden muss. Diese wächst also mit der Konzentration. Zugleich aber werden isoelektrische und isoionische Reaktion konzentrationsabhängig und stellen in diesem Sinne keine einfache Konstante des Proteins dar³⁾.

Ein bemerkenswertes Ergebnis lieferte ferner der Vergleich der κ - und der a_H -Werte in den elektrolytfrei gereinigten Ovalbuminlösungen. In den vorliegenden hohen Verdünnungen (Proteinmolarität 10^{-4} , $a_H \sim 10^{-5}$) können nämlich mit genügender Annäherung die Abweichungskoeffizienten $f_a \sim f_i \approx 1$ gesetzt werden. Ferner darf als Höchstwert der Beweglichkeit der Eiweissionen 10 angenommen werden. Dann verbleibt von der Leitfähigkeit κ der Eiweisslösung nach Abzug des auf $A'H^+$ entfallenden Anteiles κ_1 noch ein Leitfähigkeitsrest κ_2 , der nach Berücksichtigung aller Korrekturen viel zu gross ist. Die auch mit den weiter angeführten Erfahrungen in bestem Einklang stehende Erklärung dafür wäre: Das abgegebene Proton des Ovalbumin ist nicht allein mit den zugehörigen A' -Gruppen, die nur 5 % und weniger der Eiweissmolarität ausmachen, sondern mit allen A' -Gruppen des zwitterionischen Eiweiss im Gleichgewicht. Durch die Reaktion des Protons mit $^+A^-$ nach $^+A^- + H^+ \rightarrow A^+$ wird also eine positive Überschussladung entstehen, der ein Teilchen mit negativer Überschussladung A' korrespondiert. Die Grössenordnung der Anzahl Ionenpaare A^+, A' ermittelt sich so beim Ovalbumin mit 10^{-3} -n. und sie machen bei 1 % Ovalbumin 70 % der Eiweissmolarität aus, wenn man nur mit einfachen Überschussladungen rechnet. Dieser Prozentsatz nimmt erwartungsgemäss mit der Verdünnung stark zu⁴⁾.

¹⁾ Takeo Ito und Pauli, Bioch. Z. **213**, 95 (1929).

²⁾ F. Modern und Pauli, Bioch. Z. **156**, 482 (1925), und Versuche mit A. Gero.

³⁾ Pauli, Koll. Z. **40**, 185 (1926).

⁴⁾ Vgl. Tabelle V nach Versuchen mit A. Gero.

Bei dem viel schwächer sauren Seralbumin sinkt der Leitfähigkeitsrest κ_2 und entsprechend die abgeleitete Normalität der A \cdot , A'-Formen um eine Grössenordnung ab und verschwindet bei Pseudoglobulin und Hb praktisch vollständig.

Der Nachweis der Eiweissteilchen mit Überschussladungen und deren quantitative Bestimmung konnte auf einem weiteren völlig unabhängigen Wege erbracht werden.

Es war von uns schon vor Jahren gezeigt worden, dass ähnlich der Viskosität eine Abhängigkeit der Flockbarkeit durch Alkohol von der freien Ladung der Eiweissteilchen besteht, indem mit abnehmender, einsinniger Aufladung eine Zunahme der Alkohol-fällbarkeit einhergeht. Steigender Zusatz kleiner Säuremengen bewirkt so im scheinbar isoelektrischen Gebiet zunächst ein Absinken der Viskosität bis zu einem Minimum, dem eine Zunahme der Alkoholflockbarkeit bis zu einem Maximum korrespondiert, auf welches dann mit weiterem Säurezusatz zunächst der Anstieg von Viskosität und Abfall der Alkoholkoagulierbarkeit folgt. Man darf nun auf Grund des gewonnenen Bildes von der elektrochemischen Konstitution unserer hochgereinigten Ovalbuminlösungen den folgenden Ablauf der fortschreitenden Reaktion mit Säure (HCl) erwarten. Aus elektrostatischen Gründen wird die Reaktion von H \cdot mit den negativen Überschussladungen A' bevorzugt sein, wobei $A' + H \rightarrow A^0$ zu undissoziierten Formen oder unter Umständen zur neutralen zwitterionischen Form $+A^-$ führen wird. Die freibleibenden Cl' werden dem freibleibenden Rest von H \cdot bzw. den positiven Überschussladungen A korrespondieren. Danach würde das Maximum der Neutralteilchenbildung erreicht sein, sobald alle A' unter Protonaufnahme reagiert haben. In der Tat haben schon die frühesten Versuche (mit *M. Samec*) gelehrt, dass das Eiweiss im Alkohol-Flockungsoptimum nicht beidseitig, sondern rein kathodisch wandert, ferner zeigte sich, dass ein viel grösserer Eiweissanteil flockt, als etwa der H \cdot -Aktivität entspricht, die 5% und weniger der Eiweissmolarität ausmacht.

In Tabelle V sind die für Erreichung der optimalen Alkohol-flockbarkeit nötigen Zusätze von HCl neben den aus potentiometrischen a_H - und den κ -Werten abgeleiteten Normalitäten der negativen Überschussladungen A' angeführt. Die nachträglich festgestellte Übereinstimmung der Werte ist eine überaus befriedigende.

Tabelle V.

Ovalb. %	Molarität Ovalb. $m \times 10^4$	$a_H \times 10^5$	p_H	A \cdot und A' $n \times 10^4$	% von m	Normalität der negativen Überschuss- ladungen $n \times 10^5$	Säurenorma- lität im Flockungs- optimum $n \times 10^5$
1,0	2,38	1,6	4,797	1,7	71,0	10,1	8
1,75	4,165	1,9	4,721	2,6	62,4	14,9	14
2,5	5,92	2,2	4,658	3,3	55,5	18,7	20

Mit diesem Ergebnis stimmt es überein, dass praktisch bis auf wenige Prozente die zugesetzte Säure gebunden wird und dass damit nur ein sehr geringer Anstieg der H \cdot -Aktivität gegenüber derjenigen des reinen Ovalbumins einhergeht.

Ein quantitativ noch ausgiebigeres Beispiel für die Bildung der A', A'-Formen mit Überschussladungen bilden die Gelatosen¹⁾, welche aus bis zur Konstanz von κ und a_H mittels ED hochgereinigter Gelatine durch thermolytischen Abbau gewonnen werden.

Für die Versuche in Tabelle VI wurden Proben solcher 2-proz. Gelatine bei 125° im Autoklaven 10' (A), 30' (B) und 60' (C) abgebaut. Die Leitfähigkeiten sind für κ_{H_2O} korrigiert und die Werte unter der Annahme $f_{a \sim f} \approx 1$ und des eher zu hohen Mittelwertes 20 r. O. für die Beweglichkeit der Eiweissionen berechnet. κ_1 bildet den auf das Ionenpaar A', H', κ_2 den bedeutend grösseren auf A', A' entfallenden Leitfähigkeitsanteil.

Tabelle VI.

Gelatosen	Trocken- gehalt %	$\kappa_1 \times 10^6$	$\kappa_2 \times 10^5$	$a_H \times 10^5$	$n \times 10^3$ (A' + A')
A	2,153	4,7	2,43	1,27	1,22
B	1,95	4,33	3,69	1,17	1,85
C	1,95	3,83	4,48	1,04	2,24

Die Proteinanteile A', A' mit einer Normalität $n \times 10^{-3}$ tragen hier den Hauptteil der Leitfähigkeit κ_2 , welcher mit dem fortschreitenden Abbau und der steigenden Teilchenzahl unter abnehmender H'-Aktivität beträchtlich anwächst.

Durch Elektrodialyse der Gelatosen erfolgt nun ein Anstieg von a_H und κ_1 und gleichzeitig ein Abfall von κ_2 und n (A' + A') auf ein Drittel bis ein Fünftel. Dieses Verhalten steht in bestem Einklang mit der angenommenen elektrochemischen Konstitution. Von dem stark heterodispersen Gelatosengemisch gehen die kleinsten A'-A'-Teile unter Absinken von κ_2 durch die Membran. Da diese (Pergamentpapier, Cellophan) elektronegativer ist, werden die A' leichter passieren und die A' mehr zurückgehalten, wie dies auch durch die starke Biuret- und Trichloressigsäurereaktion in der kathodischen Seitenzelle angezeigt wird. Gleichzeitig treten durch Membranhydrolyse unter Ansteigen von a_H (und κ_1) die den zurückgehaltenen A' entsprechenden H'-ionen auf.

Eine bestätigende Gegenprobe bilden die Versuche²⁾ von Tabelle VII, bei welchen durch Abbau bei 125° (1 Stunde) bereiteten Gelatosen (a) zunächst mittelst negativer Membranen (b), darauf mit negativer kathodischer, positiver anodischer Membran (c) der ED unterworfen wurden. Sämtliche Gelatosen 1%. Sie zeigen einerseits den stetigen Abfall von κ , andererseits den Anstieg von a_H in Versuch (b) und den Abfall von a_H durch die Einschaltung der positiven Membran (c), welche für die A'-Formen durchlässiger ist.

¹⁾ Pauli und J. Safrin, Bioch. Z. **233**, 86 (1931).

²⁾ Ed. Goigner und Pauli, Bioch. Z. **235**, 271 (1931).

Tabelle VII.

Gelatosen	$\kappa \times 10^5$	$a_H \times 10^5$
a	4,1	1,04
b	2,5	2,51
c	1,1	1,3

Zum Schlusse wären noch einige Besonderheiten in der Beeinflussung der Hitzeegerinnung von Seralbumin und Ovalbumin durch Neutralsalz¹⁾ anzuführen, die auf elektrochemisch-konstitutiven Differenzen der beiden Eiweisskörper beruhen. Den ersten Schritt bei der Hitzedenaturierung bildet nach unserer Auffassung²⁾ die Aufhebung der zwitterionischen Struktur unter wechselseitiger Absättigung und Anhydrierung. Eine gewisse Fixierung des zwitterionischen Zustandes erfolgt, wie schon erwähnt, durch zugefügtes Neutralsalz unter Ausbildung einer alternativen Gegenionenwolke. Bei Seralbumin ist dies als Hemmung der Hitzeegerinnung unter Erhöhung der Koagulationstemperatur (ΔT°) durch Neutralsalz sehr ausgesprochen. Fig. 10 gibt solche Versuche wieder.

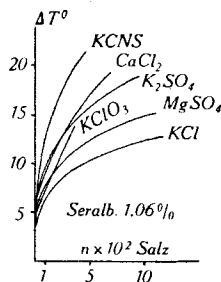


Fig. 10.

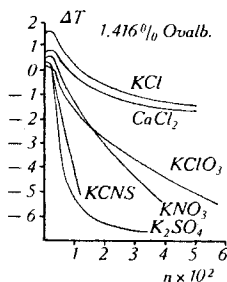


Fig. 11.

Anders ist das Bild beim Ovalbumin (Fig. 11). In ganz niederen Salzkonzentrationen von wenigen 0,001-n. besteht hier gleichfalls Hemmung der Koagulation, Erhöhung der Koagulationstemperatur. Dann aber folgt mit steigendem Salzgehalt nach Passieren eines Maximums ein beträchtlicher Abfall der Koagulationstemperatur.

Die Reihenfolge der Ionen Cl, ClO₃, NO₃, SCN, SO₄ nach stark zunehmender Förderung der Hitzeegerinnung entspricht der Reihe der Entladung und Flockungswirkung auf positives Eiweiss. Demnach wäre anzunehmen, dass hier die A'-Anteile des Ovalbumins

¹⁾ Pauli und J. Weissbrod, Koll. Beih. **12**, 429 (1935).

²⁾ Pauli und R. Weiss, Bioch. Z. **233**, 381 (1933).

die negativen Gegenionen aus deren Konzentrationen stärker inaktivieren. Diese Teilchen wirken dann beim Erwärmen als Keime für die Anlagerung von anderen und als Beschleuniger der Hitze-koagulation. Solche Keimwirkungen lassen sich schon mit 0,001 % Zusätzen von denaturiertem Ovalbumin zu 1 % Ovalbumin als starke Depression der Koagulationstemperatur nachweisen. Im Sinne derartiger Mitwirkung der A'-Teilchen des Ovalbumin spricht schliesslich auch der folgende Versuch.

Ein durch ED hochgereinigtes Ovalbumin zeigt bei längerem Stehen durch CO_2 -Aufnahme eine Zunahme von α als Ausdruck einer Reaktion von Aminogruppen unter Elektropositivierung. Durch neuerliche ED wird diese Veränderung gänzlich zurückgebildet. Ein solches gestandenes Ovalbumin erfährt in der Tat eine gesteigerte Neutralsalzwirkung im Sinne eines stärkeren Abfalles von η gegenüber dem gleichen jedoch neuerlich durch ED gereinigten Sol. Darüber belehrt Fig. 12 an einem 3,07-proz. Ovalbumin + KCl, die keiner Erläuterung bedarf.

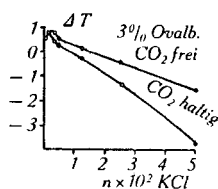


Fig. 12.

*

Die hier wiedergegebenen Beobachtungen und der Versuch ihrer inneren Verknüpfung können nur tastende Schritte auf einem Gebiet bedeuten, das der weiteren experimentellen Erforschung mannigfache und überaus interessante Aufgaben erschliessen dürfte.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.