



Stremming van ovalbumine door verwarming

<https://hdl.handle.net/1874/315079>

STREMMING VAN
OVALBUMINE
DOOR VERWARMING

J. R. DE JONG



BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

STREMMING VAN OVALBUMINE
DOOR VERWARMING

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



2738 253 4

STREMMING VAN OVALBUMINE DOOR VERWARMING

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN
DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN
NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVER-
SITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DE
RECTOR-MAGNIFICUS Dr. C. G. N. DE VOOYS,
HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER
LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS
BESLUIT VAN DE SENAAT DER UNIVER-
SITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 30 JUNIE
1933, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR,

DOOR

JOHAN RICHARD DE JONG
GEBOREN TE 's-GRAVENHAGE

H. J. PARIS
AMSTERDAM 1933

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN VROUW

Het verschijnen van dit proefschrift is voor mij een welkome aanleiding om dank te zeggen aan allen, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

In de eerste plaats richt ik mij tot U, Hooggeleerde KRUYT, Hooggeachte Promotor. Uw scherpe kritiek en Uw heldere betoogtrant hebben een grote indruk op mij gemaakt. Zij zullen mij steeds als voorbeeld voor ogen blijven. De krachtige leiding en de persoonlijke steun, welke ik van U mocht ondervinden, hebben de voltooiing van dit proefschrift eerst mogelijk gemaakt. Deze factoren en de nooit verflauwende belangstelling in mijn onderzoek, dringen mij er toe, U ook op deze plaats mijn hartelijke dank te betuigen.

De jaren, gedurende welke ik het biezonder voorrecht genoot Uw assistent te zijn, zal ik steeds blijven beschouwen als het hoogtepunt van mijn studietijd. De uren ten Uwen huize doorgebracht, laten bij mij de aangenaamste herinneringen achter.

Hooggeleerde COHEN, U ben ik in hoge mate erkentelijk voor hetgeen ik van U op college en practicum mocht leren. Ik beschouw het als een voorrecht, als assistent in het van 't Hoff-Laboratorium te zijn opgenomen. Hierdoor was het mij mogelijk mijn studie in persoonlijk contact met U te beeindigen, wat door mij zeer op prijs wordt gesteld.

Biezondere gevoelens van dankbaarheid koester ik jegens U, Hooggeleerde SCHOORL. Uw boeiende colleges gaven mij een uitstekend inzicht in de practiese toepassingen der chemie. De belangstelling, welke Gij voortdurend voor mij en mijn werk hebt getoond, is voor mij onvergetelijk. De gastvrije wijze, waarop Gij Uw laboratorium en de benodigde hulpmiddelen steeds ter beschikking stelde, maakte het mij mogelijk talrijke proefnemingen met succes te verrichten. Voor Uw grote hulpvaardigheid betuig ik U mijn oprechte dank.

Ook U, Hooggeleerde DE GRAAFF, ben ik zeer dankbaar voor hetgeen ik onder Uw leiding mij ten nutte heb mogen maken.

Hooggeleerde RUZICKA, aan U heb ik een belangrijk gedeelte van mijn theoretiese en practiese vorming op het gebied der organiese chemie te danken.

Doch ook aan Uw colleges en practica, Hooggeleerde VAN ROMBURGH, zullen mij steeds de aangenaamste herinneringen bijblijven.

Door de grote welwillendheid, waarmede Gij, Zeergeleerde MOESVELD, mij voortdurend met raad en daad terzijde hebt willen staan, hebt Gij mij sterk aan U verplicht. Ik ben U grote dank verschuldigd, zowel voor Uw vriendschappelijke omgang als voor de steun, welke ik van U mocht ondervinden.

Zeergeleerde KOLKMEIJER, weest ervan verzekerd, dat ik Uw vriendschap en hulpvaardigheid op hoge prijs stel.

Met veel genoegen denk ik aan de besprekingen, welke ik meerdere malen met U mocht hebben, Zeergeleerde TENDELOO. Dat Gij U de moeite hebt willen geven, over verschillende problemen, dit proefschrift betreffende, met mij van gedachten te wisselen, stemt mij zeer dankbaar.

Waarde KISJES. Gaarne betuig ik ook U mijn warme dank voor de tijdens mijn assistentschap zo veelvuldig geboden hulp, welke onze vriendschappelijke verhouding versterkte.

Aan het personeel van het van 't Hoff-Laboratorium breng ik mijn dank voor de grote medewerking, welke ik steeds heb ondervonden.

INHOUD

	Blz.
INLEIDING	1
I – EXPERIMENTEEL GEDEELTE	
HOOFDSTUK I – Bereiding der ovalbuminesolen	5
HOOFDSTUK II – Methodiek der viscositeitsmetingen . .	8
HOOFDSTUK III – Bepalingen der viscositeit bij verschil- lende temperaturen	11
HOOFDSTUK IV – Viscositeitsmetingen aan gedehydrateerde ovalbuminesolen	26
HOOFDSTUK V – Viscositeitsmetingen aan gelatinesolen .	30
II – HISTORIES GEDEELTE	
HOOFDSTUK VI – Oudere literatuur	33
HOOFDSTUK VII – Het „denatureringsproces” opgevat als wateronttrekking	36
HOOFDSTUK VIII – Het „denatureringsproces” beschouwd als wateropname	50
HOOFDSTUK IX – Invloed van neutrale zouten op gedehy- drateerd albumine	59
HOOFDSTUK X – Reversibiliteit	63
HOOFDSTUK XI – Door alkohol gedehydrateerde eiwitten	68
OVERZICHT	71
LITERATUUROVERZICHT	73

INLEIDING

De mogelijkheid om een kolloïdchemiese verklaring op te stellen voor de coagulatie van albuminesolen bij verwarming, is gegeven door een onderzoek van KRUYT en BUNGENBERG DE JONG (1) over de hydratatie van agarsolen.

Hierbij is vastgesteld, dat de hydratatie reversiebel afneemt bij verhoging der temperatuur van het sol en dat deze veranderingen optreden onafhankelijk van de graad van aggregatie, door de agar-deeltjes bereikt.

Natieve albuminesolen blijven stabiel, wanneer de waterstof-ionenconcentratie wordt gebracht op die van het isoelectrische punt (in dit geval bij $pH = 4,8$ gelegen). De stabiliteit op dit punt wordt echter opgeheven door toevoeging van een gelijk volume aethyl-alkohol 96 %, waaruit mag worden afgeleid, dat de albumine-deeltjes een deel van hun stabiliteit te danken hebben aan een bepaalde hydratatiegraad.

Het gedrag van deze solen bij verwarming is sterk afhankelijk van de waterstof-ionenconcentratie in het milieu.

Een isoelectrische albuminesol, waaraan door electrodialyse de electrolyten zo goed mogelijk onttrokken zijn, is bij verhitting op temperaturen boven 50°C niet stabiel: het sol wordt opalescent en vlokt tenslotte uit.

Heeft men vóór de verwarming de potentiaal der deeltjes voldoende verhoogd door toevoeging van een zuur of base, dan treedt bij 100°C geen uitvlokking meer op. Toch heeft er een verandering in het sol plaats gegrepen; bij aanwezigheid van zeer kleine hoeveelheden neutrale zouten gedraagt het zich als een niet gehydrateerd, dus hydrophoob kolloïd.

De hydrophiele kenmerken van het natieve albuminesol blijken dus verdwenen te zijn. Hierdoor dringt de overweging zich op, dat door verwarming de hydratatiegraad der deeltjes wordt gewijzigd. Waarschijnlijk is het mechanisme van de reactie, die in verhitte

albuminesolen verloopt, identiek met het proces, dat zich bij verwarming van agarsolen afspeelt.

Door BUNGENBERG DE JONG (2) werd nagegaan, hoe de relatieve viscositeit van een $1/7\%$ agarsol varieerde, wanneer dit sol achtereenvolgens op 50° , 45° , 40° , 45° , 50° en 40° C werd gebracht. De gevonden waarden bleken reversiebel te veranderen door een reversiebele variatie van de hydratatie der deeltjes (zie tabel 1, kolommen 1 en 2).

TABEL 1.

Temp.	$\frac{\eta_s}{\eta_w}$	Gelatinering bij 35°		Temp.	$\frac{\eta_s}{\eta_w}$
		Tijd	$\frac{\eta_s}{\eta_w}$		
50	1,656	5	1,694	35	1,732
45	1,666	10	1,701	40	1,715
40	1,676	15	1,704	45	1,705
45	1,665	20	1,709	50	1,696
50	1,656	25	1,716	45	1,703
40	1,677	30	1,722	40	1,713
(35)	(1,689)	34	1,728	35	1,730
		44	1,733		
		49	1,731		

Vervolgens werd bij 35° C de gelatinering van hetzelfde sol onderzocht. De door extrapolatie berekende waarde voor de relatieve viscositeit bij 35° C kwam geheel overeen met de experimenteel gevonden grootheid. Dit bewees, dat bij een snelle afkoeling van het sol tot 35° C het hierbij behorende hydratatie-evenwicht zich instelde, voordat de invloed der beginnende gelatinering merkbaar werd (tabel 1, kolommen 3 en 4).

Het laatstgenoemde proces deed bij constante temperatuur de viscositeit langzaam toenemen met de tijd. De waargenomen vermeerdering bedroeg maximaal enige procenten van de oorspronkelijke waarde. Steeds volgde dan een korte periode, waarin de viscositeit geen verandering onderging. Tenslotte trad daarna voor de tweede maal een stijging op, doordat het sol verder gelatineerde. Slechts het gebied van de eerste gelatinering en van de constante viscositeitswaarden was behoorlijk reproduceerbaar. De viscositeit

was hier onafhankelijk van de stroomsnelheid van het sol in de capillair; aan de wet van POISEUILLE werd voldaan.

Het tweede gelatineringsproces was niet reproduceerbaar en verliep steeds zeer onregelmatig; het begrip viscositeit miste hiervoor iedere betekenis. Uit de aggregaten der deeltjes vormden zich blijkbaar grotere vlokken, waarvan de afmetingen belangrijk waren ten opzichte van de diameter van de capillair.

De metingen werden voortgezet, wanneer het sol bij 35° C zover gegelatineerd was, dat de viscositeit zich bevond in het constante gebied. Bij 40°, 45°, 50°, 45° en 40° C werd dan de relatieve viscositeit bepaald. De gevonden waarden bleken reversibel met de temperatuur te veranderen en wel geheel parallel met de viscositeit van het niet gegelatineerde sol. Voor deze laatste werden echter lagere waarden verkregen (figuur 1, curve *a*) dan voor de eerstgenoemde (tabel 1, kolommen 5 en 6 en figuur 1, curve *b*).

De viscositeitsvermeerdering, bij 35° C ontstaan, verdween dus niet bij verwarming boven 40° C, maar gedroeg zich als een constante factor. Dit wees er op, dat de vermeerdering toegeschreven moest worden aan een ingetreden aggregatie der gehydrateerde agardeeltjes. Het karakter der deeltjes bleef namelijk hetzelfde, want de afhankelijkheid der viscositeit (en dus ook der hydratatie) van de temperatuur was niet veranderd. Door de aggregatie was het werkzame volume der deeltjes echter vergroot. Alle φ -waarden waren dus met een constante factor vermenigvuldigd, terwijl de deeltjes toch hun oorspronkelijke hydratatie behielden. Bovendien was de beginnende aggregatie nog zo gering, dat de stroming van het sol mechanies niet gestoord werd. Men was daardoor in staat om reproduceerbare metingen te verrichten.

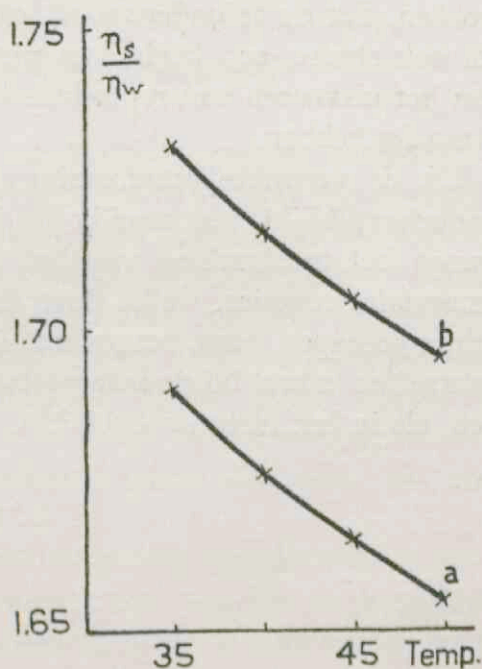


Fig. 1

Onafhankelijk van de aggregatietoestand der deeltjes bleek dus, bij verhoging der temperatuur van een agarsol, een daling der relatieve viscositeit op te treden. Dit effect was reversibel en moest beschouwd worden als een dehydratatie der agardeeltjes.

Wanneer een dergelijk proces zich ook bij de verhitting van albuminesolen afspeelde, zou dit uit de veranderingen der relatieve viscositeit van die solen moeten blijken. Het was dus noodzakelijk om deze variaties met grote nauwkeurigheid na te gaan. De omstandigheden, waaronder dit gebeurde, moesten intussen zodanig gekozen worden, dat de te onderzoeken reactie plaats had, zonder dat het sol ook slechts een begin van uitvlokking vertoonde. Dit laatste zou het uitvoeren van reproduceerbare metingen geheel onmogelijk gemaakt hebben.

Uit de verrichte proefnemingen en uit de literatuur over dit onderwerp blijkt, hoe moeilijk het is, om een onderscheid te maken tussen het mechanisme van het belangrijkste proces en dat der secundaire reacties, welke door dezelfde agentia worden te voorschijn geroepen, resp. bevorderd. Deze onderscheiding zal men dus aantreffen, zowel bij de interpretatie der uitgevoerde onderzoekingen, als in het histories overzicht.

EXPERIMENTEEL GEDEELTE

HOOFDSTUK I

Bereiding der ovalbuminesolen

Het sol X werd bereid uit ovalbuminepoeder (van de Fa. MERCK), dat door schudden met tweemaal gedestilleerd water een ongeveer 2 % sol vormde. Een spoor thymol werd toegevoegd ter conservering, waarna het sol in het electro-dialyse-apparaat (model volgens PAULI) (3) werd gebracht. De middenkamer van het toestel was afgesloten door twee collodiummembranen, welke zo goed mogelijk impermeabel voor eiwit waren gemaakt. Na het gieten werden zij namelijk gedurende zes uren aan de lucht bij kamertemperatuur gedroogd en daarna met gedestilleerd water gewassen, tot alle alcohol en aether waren verwijderd.

Wanneer bij electro-dialyse twee negatieve membranen werden gebruikt (van collodium of perkament), dan wisselde de waterstof-ionenconcentratie van het sol veelvuldig, vóór de eindwaarde werd bereikt. Hierdoor konden de eigenschappen van het sol op ongewenste wijze veranderen.

Eén der collodiummembranen werd daarom voor het gebruik omgezet in een ovalbuminemembraan op de wijze, zoals door ETTISCH en EWIG (4) is aangegeven. In dit geval werden de alcohol en aether niet verwijderd door wassen met gedestilleerd water, maar werd als spoelvoeistof gebruikt een 2 % ovalbuminesol, waaraan door dialyse de grootste hoeveelheid electrolyt onttrokken was.

Het membraan werd daarna nog gedurende enige dagen in het ovalbuminesol bewaard, tot het geheel ondoorzichtig was geworden. Dit albuminemembraan werd aan de anodezijde van de middencel geplaatst; aan de kathode werd een gewoon collodiummembraan aangebracht.

Gedurende de electrodialyse werd met behulp van een voorschakelweerstand de stroomsterkte zodanig geregeld, dat het sol niet meetbaar werd verwarmd. Naarmate het electries geleidingsvermogen daalde, werd de stroomspanning opgevoerd, tot deze 220 Volt was geworden. Als spoelvloeistof werd gedestilleerd water gebruikt, dat met constante snelheid door de zijkamers van het apparaat gevoerd werd. De electrodialyse werd voortgezet tot het electries geleidingsvermogen van het sol was afgenomen tot $1,1 \cdot 10^{-5}$ rec. Ohm. De geprecipiteerde globulinen werden afgefiltreerd en het sol bij 0°C bewaard. De pH ervan was 4,8. Het sol bevatte ongeveer 0,2 % ovalbumine, terwijl $d_4^{20} = 0,9981$ was.

Het sol Y werd op dezelfde wijze bereid. De electrodialyse tegen gedestilleerd water werd voortgezet tot het electries geleidingsvermogen van het sol niet verder daalde. Vervolgens werd electries gedialyseerd tegen tweemaal gedestilleerd water, tot het electries geleidingsvermogen opnieuw constant was geworden, waarbij het een waarde van $0,9 \cdot 10^{-5}$ rec. Ohm bereikte. De pH van het sol was 4,8.

Het sol Z werd verkregen uit het wit van 40 verse kippeneieren (5). Dit werd tot schuim geklopt met een gelijk volume van een verzadigde oplossing van ammoniumsulfaat. Nadat het mengsel gedurende 12 uren bij 0°C was bewaard, was het weer geheel vloeistof geworden. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd en aan het filtraat werd zoveel van een verzadigde oplossing van ammoniumsulfaat toegevoegd, dat een duidelijke troebeling ontstond. Daarna werd 0,2 *N* zwavelzuur toegevoegd, waardoor de opalescentie verdween; bij verdere toevoeging van het zuur werd echter opnieuw een neerslag gevormd. Het mengsel werd zodanig aangezuurd, dat het laatstgenoemde precipitaat door roeren nog juist in oplossing kon worden gebracht.

Onder flink roeren trad na enige uren reeds een afscheiding van het „gekristalliseerde ovalbumine” op. Het mengsel werd gedurende 7 dagen bij kamertemperatuur bewaard, waarna het gevormde neerslag op 5 filters van de vloeistof werd gescheiden.

Nauwkeurig werd nagegaan, welke concentratie aan een ammoniumsulfaatoplossing moest worden gegeven, opdat 10 cm^3 hier-

van, samengebracht met 2 cm³ filtraat, dit juist niet tot opalescentie brachten.

Een oplossing van deze sterkte werd dan als wasvloeistof voor het neerslag gebruikt. De filters werden er mede gevuld en het precipitaat door roeren zo fijn mogelijk verdeeld in de vloeistof. Nadat de ammoniumsulfaatoplossing was afgevoerd, werd het albumine door fijnwrijven opgelost in tweemaal gedestilleerd water.

Het zo verkregen sol werd opnieuw neergeslagen met behulp van een verzadigde oplossing van ammoniumsulfaat. Hiervan werd zoveel toegevoegd, dat het gevormde neerslag nog juist door flink roeren in oplossing kon worden gebracht. De vloeistof werd geënt met een weinig gekristalliseerd ovalbumine en na zeven dagen was het eiwit opnieuw geprecipiteerd.

Deze gefractioneerde precipitatie werd nog vijf maal herhaald, waardoor een ovalbuminesol werd verkregen, dat geen mucoid en conalbumine bevatte en dat practies asvrij was.

Een gedeelte van het sol werd in een ster-dialysator (6) gedialyseerd tegen gedestilleerd water gedurende 100 uren, terwijl een spoor thymol was toegevoegd om bacteriegroei te verhinderen. Het sol bevatte toen een overmaat zwavelzuur; het werd daarom met verdunde ammonia bedeed, tot het juist basies reageerde op phenol-rood. Vervolgens werd de dialyse voortgezet, totdat in 1 liter van de aflopende vloeistof (na indamping tot 10 cm³) met bariumchloride geen sulfaationen meer aantoonbaar waren.

Daar het waarschijnlijk was, dat het sol verontreinigingen opnam uit onderdelen van de dialysator, werd deze methode niet verder toegepast.

In een BECHHOLD-beker voor ultrafiltratie (7) werd een collodium-membraan aangebracht, dat zeer weinig permeabel was voor ovalbumine. Na een zorgvuldige reiniging van het geheel, werd de beker gevuld met 150 cm³ sol. Daarna werden 120 cm³ intercellaire vloeistof door het membraan gezogen met behulp van een aangebracht vacuum. De in de beker achtergebleven vloeistof werd weer tot 150 cm³ aangevuld met tweemaal gedestilleerd water en het afzuigen werd voortgezet. Door dit proces ongeveer tien maal te herhalen, bleek het mogelijk, om vrijwel alle electrolyten aan het sol te onttrekken.

De gebruikte stoffen waren preparaten p.a. van de Fa. MERCK.

Het ammoniumsulfaat werd bovendien gezuiverd, door het op te lossen in tweemaal gedestilleerd water en neer te slaan met gefractioneerde aethylalkohol. Deze manipulatie werd nog tweemaal herhaald.

HOOFDSTUK II

Methodiek der viscositeitsmetingen

Van de solen werden bij constante pH en temperatuur gemeten de dichtheid d_s en de doorlooptijd t_s . Bij dezelfde temperatuur werden deze grootheden bepaald voor de intermicellaire vloeistof (d_e en t_e). De relatieve viscositeit van het sol werd berekend uit: $\frac{\eta_s}{\eta_e} = \frac{t_s \cdot d_s}{t_e \cdot d_e}$. In de volgende besprekingen werd steeds gebruik gemaakt van de grootheid: $\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$, welke beschouwd werd als een functie van φ , het werkzame volume der soldeeltjes, uitgedrukt als fractie van het totale volume (8).

Voor de bepaling der doorlooptijden werd gebruik gemaakt van viscosimeters volgens OSTWALD. De meters geven vaak aanleiding tot het maken van systematische fouten; zij werden daarom door de Fa. LAMÉRIS, Utrecht, nauwkeurig gebouwd en geijkt volgens de aanwijzingen, door BUNGENBERG DE JONG gepubliceerd (9). Met de uiterste zorg werd er voor gewaakt, dat geen schuim en mechanische verontreinigingen in de te meten solen aanwezig waren. Ook de meetmethode werd toegepast, zoals deze door BUNGENBERG DE JONG is aangegeven.

Voor de tijdmetingen werd een stophorloge gebruikt, dat 0,1 sekonden aangaf. De aanwijzingen ervan werden regelmatig vergeleken met die van andere chronometers en met het radiotijdsein. Door tevens viscosimeters te gebruiken met lange doorlooptijden (tussen 200 en 600 sekonden), werden de fouten in de tijdmetingen zoveel mogelijk gereduceerd.

De bepalingen werden in het algemeen verricht door de viscositeit bij 20,01° C te meten en daarna de viscosimeter met inhoud achtereenvolgens te brengen in gereedstaande thermostaten, met

verschillende, steeds hogere temperaturen. Bij temperaturen boven 40° C kon dit niet worden voortgezet, omdat het albuminesol dan met meetbare snelheid een irreversiebele ontleding onderging, waarbij eenvoudiger verbindingen uit het eiwit werden vrijgemaakt. Zoals ook bij andere lyophile solen werd vastgesteld, moest dit worden toegeschreven aan de hydrolyserende werking van het water (10, 56).

Viscositeitsmetingen zijn in het algemeen zeer geschikt om ontleding van eiwitten in soltoestand aan te tonen. De gevormde albumosen en peptonen vertonen namelijk in oplossing een veel kleinere viscositeit dan het oorspronkelijke eiwitsol (11).

Deze ontledingsreactie was de oorzaak, dat bij hogere temperaturen viscositeitswaarden werden gevonden, welke gedurende de waarneming voortdurend daalden. Om de verkregen resultaten onderling te kunnen vergelijken, was het gewenst, hiervoor een correctie in te voeren. Op deze wijze werden alle viscositeiten door extrapolatie berekend voor het tijdstip 0, dit betekent: voor het ogenblik, waarop de viscosimeter in de betrokken thermostaat werd gebracht.

Het volgende voorbeeld moge ter verduideliking dienen. Voor de relatieve viscositeit werden bij sol Y bij een $pH = 2,6$ de volgende waarden gevonden bij 90,14° C:

TABEL 2.

Tijd	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$
15.50 u.	sol op 90,14° C gebracht
15.55	0,040
16.—	0,037
16.07	0,034
16.20	0,028
16.30	0,026
16.40	0,024

Om de gecorrigeerde waarde voor de viscositeit te vinden, moest door extrapolatie de waarde bepaald worden, welke deze om 15.50

uur zou hebben gehad. Op dat ogenblik namelijk werd de viscosimeter in de thermostaat van 90,14° C gebracht en snel geschud. In dit geval werd de waarde van de relatieve viscositeit op het tijdstip 0 vastgesteld op 0,043 (zie figuur 2).

Bij temperaturen boven 40° C werd voor iedere meting, welke bij een bepaalde temperatuur plaats had, de viscosimeter voorzien van een nieuwe hoeveelheid sol.

Om te kunnen nagaan, of gedurende de tijd, dat een serie be-

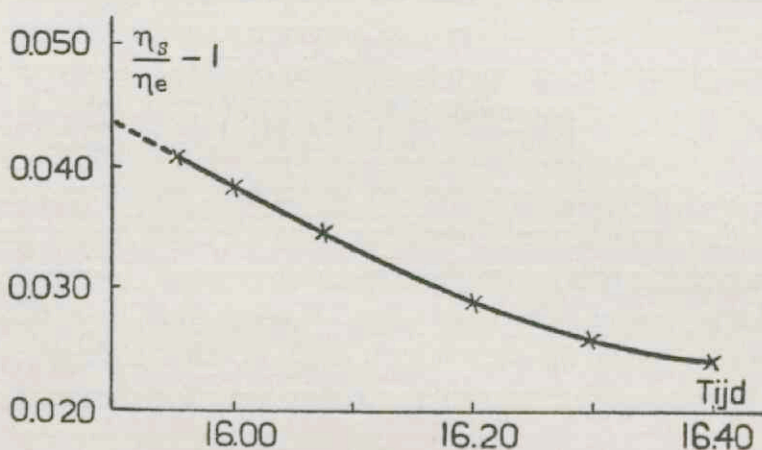


Fig. 2

palingen werd gedaan, de viscositeit van het sol niet veranderde, werd van iedere vulling tevens de doorlooptijd bij 20,01° C gemeten. Alle bepalingen geschieden in duplo; de waarden, welke het karakter van het verloop der curven bepaalden, werden in triplo vastgelegd.

Zowel vóór iedere meting, als direct erna, werd de pH bepaald bij 20° C van de gebruikte hoeveelheid albuminesol. De twee zo verkregen waarden vertoonden uitsluitend afwijkingen, die binnen de foutengrens van de gebruikte methoden vielen ($\pm 0,05$).

Voor pH waarden kleiner dan 5,0 werd de colorimetrische methode toegepast. De kleur, die de aan het sol toegevoegde indicator aannam, werd vergeleken met de kleur, welke dezelfde indicator vertoonde in een reeks buffermengsels, met bekende waterstofionenconcentraties (12).

Om de zout- en eiwitfouten der verschillende indicatoren zo goed mogelijk te elimineren, werd iedere pH -waarde bepaald met behulp

van minstens twee indicatoren. De waterstofionenconcentraties, welke overeenkwamen met een pH groter dan 5,0, werden gemeten met behulp van een waterstofelectrode [door de Fa. LAMÉRIS, Utrecht, vervaardigd naar het model volgens MICHAELIS (13)], waarvan de potentiaal bepaald werd in combinatie met een 0,1 N calomelelectrode.

HOOFDSTUK III

Bepalingen der viscositeit bij verschillende temperaturen

Bij het sol *X* (MERCK's ovalbumine) bleken de viscositeitswaarden te veranderen met de temperatuur, zoals in tabel 3 is aangegeven.

Voor het sol *Y* (MERCK's ovalbumine) zijn deze waarden in tabel 4 gerangschikt.

Het sol *Z* leverde de resultaten, welke in tabel 5 te vinden zijn.

TABEL 5

Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$			
	pH			
	2,5	3,0	4,2	4,8
20,01	0,064	0,094	0,072	0,054
29,91	0,065	0,094	0,071	0,056
40,00	0,067	0,096	0,071	0,051
50,26	0,095	0,097	0,069	uitvlok-
60,28	0,117	uitvlok-	uitvlok-	king
70,05	0,135	king	king	
80,24	0,159			
90,14	0,199			

Uit dit materiaal blijkt, dat in geen geval een viscositeitsvermindering, welke een dehydratatie der albuminedeeltjes zou aanduiden, was waar te nemen. De viscositeit nam juist toe met de temperatuur.

TABEL 3.

Georri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$ pH									
	2,4	3,0	4,1	4,5	4,8—5,5	6,5—7,0	7,8	11,3		
20,01	0,025	0,055	0,060	0,032	0,013	0,015	0,017	0,023		
29,91	0,026	0,055	0,060	0,035	0,014	0,017	0,018	0,023		
40,00	0,028	0,055	0,061	0,043	0,015	0,017	0,019	0,025		
50,26	0,029	0,056	0,062	[0,094]	0,019	0,025	0,027	0,031		
60,28	0,030	0,062	0,078	uitvlok- king	uitvlok- king	uitvlok- king	uitvlok- king	0,040		
70,05	0,032	0,068	0,089	king				0,047		
80,24	0,036	0,076	0,101					0,055		
90,14	0,037	0,084	0,112					0,064		

TABEL 4.

Georri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$ pH									
	1,2	1,5	1,8	2,3	2,6	4,0	4,3	5,0	9,7	11,5
20,01	0,008	0,013	0,017	0,019	0,033	0,038	0,023	0,006	0,009	0,018
40,00			0,019	0,022		0,039	0,024	0,005	0,008	0,018
50,02	0,016	0,017	0,019	0,024	0,033	0,043 _d	[0,045]	uitvlok- king	0,012	0,019
60,02	0,018	0,017	0,022	0,024	0,035	0,044	uitvlok- king		0,014	0,032
80,24	0,021	0,020	0,022	0,027	0,039	0,048			0,016	0,038
90,14	0,020	0,019	0,021	0,028	0,043	0,049			0,019	0,039

De eigenschappen van het tot 100° C verhitte ovalbuminesol wezen er op, dat onder de heersende omstandigheden de coagulatie bij verwarming als een irreversiebel proces moest worden beschouwd.

Het was dus belangrijk om na te gaan of ook de gevonden vermeerdering der viscositeit niet omkeerbaar was.

Hiertoe werd het viscositeitsverloop bepaald van een sol, dat van lagere op hogere temperatuur was gebracht en daarna weer tot de oorspronkelijke temperatuur werd afgekoeld. Zowel de viscositeit, welke bij hoge temperatuur werd bepaald, als die, welke na afkoeling van het sol werd gemeten, moesten gecorrigeerd worden voor de ontledingsreactie, welke het albumine vertoonde gedurende de tijd, dat het op hoge temperatuur werd gehouden.

Uit de volgende berekening moge blijken, hoe deze correcties werden vastgesteld. Voor het sol Y werd bij 90,14° C en $pH = 2,6$ uit de afname van de viscositeit met de tijd gevonden, dat op het tijdstip 0 een waarde $= 0,043$ moest worden aangenomen voor $\frac{\eta^s}{\eta^e} - 1$. Twintig minuten later was de viscositeit tot 0,032 gedaald (zie blz. 9). Na 20 minuten werd de viscosimeter snel afgekoeld tot 20,01° C, waarna de viscositeit $= 0,019$ bleek te zijn geworden. Bij 90,14° C was de daling in dit tijdsverloop 0,011.

De ontledingsreactie verminderde dus de relatieve viscositeit van het sol met 34 % van de bereikte eindwaarde. De daarna bij 20,01° C bepaalde viscositeit moest bij herleiding tot het tijdstip 0 met een gelijke fractie worden verhoogd. Deze correctie werd dan 34 % van $0,019 = 0,006$. Als gecorrigeerde waarde voor deze viscositeit werd dus 0,025 gevonden.

Aan het sol X werden de irreversiebele reacties gemeten, welke in de tabel 6 zijn aangegeven.

Tabel 8 geeft de uitkomsten van overeenkomstige metingen, die aan het sol Y werden verricht, terwijl in tabel 7 de waarden voor het sol Z worden aangetroffen.

Uit deze tabellen blijkt nog, dat in verscheidene gevallen de irreversiebele reactie ook gemeten is bij temperaturen, gelegen tussen 90° en 20° C. De zo gevonden punten vormen continue curven, waarvan het verloop geheel analoog is aan dat van de lijnen in figuur 3.

TABEL 6

$pH = 2,4$		$pH = 3,0$		$pH = 11,3$	
Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$	Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$	Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$
20,01	0,025	20,01	0,055	20,01	0,023
↓		↓		↓	
90,14	0,037	90,14	0,084	90,14	0,064
↓		↓		↓	
20,01	0,022	20,01	0,058	20,01	0,059
40,00	0,028				
↓		40,00	0,055	40,00	0,025
90,14	0,037	↓		↓	
↓		90,14	0,084	90,14	0,064
40,00	0,026	↓		↓	
		40,00	0,061	40,00	0,060
$pH = 4,1$					
20,01	0,060	60,28	0,062	60,28	0,040
↓		↓		↓	
90,14	0,112	90,14	0,084	90,14	0,064
↓		↓		↓	
20,01	0,097	60,28	0,069	60,28	0,061
20,01	0,060	20,01	0,055	20,01	0,023
↓		↓		↓	
70,05	0,089	60,28	0,062	70,05	0,047
↓		↓		↓	
20,01	0,060	20,01	0,057	20,01	0,046

TABEL 7

$pH = 2,5$	
Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$
20,01	0,064
↓	
90,14	0,199
↓	
20,01	0,182
60,28	0,117
↓	
90,14	0,199
↓	
60,28	0,185
20,01	0,064
↓	
70,05	0,135
↓	
20,01	0,081
20,01	0,064
↓	
40,00	0,067
↓	
20,01	0,067

TABEL 8

Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$							
	pH							
	1,2	1,5	1,8	2,3	2,6	4,0	9,7	11,5
20,01	0,008	0,013	0,017	0,019	0,033	0,038	0,009	0,018
↓								
90,14	0,020	0,019	0,021	0,028	0,043	0,049	0,019	0,039
↓								
20,01	0,010	0,013	0,010	0,017	0,025	0,036	0,019	0,029

De solen ondergingen dus bij hogere temperaturen veranderingen, waarbij de relatieve viscositeit voortdurend irreversiebel toenam. Later zullen enige argumenten worden aangevoerd, die er voor pleiten, dat een beginnende aggregatie der soldeeltjes hiervan de oorzaak was.

Bevond het sol zich in de buurt van het isoelectrische punt, waarbij de potentiaal der deeltjes zijn minimum waarde bereikte, dan volgde bij hogere temperaturen op deze aggregatie zó snel een verdere aanéénlegging der deeltjes, dat het sol niet stabiel bleef, maar een begin van uitvlokking vertoonde. De relatieve viscositeit nam hierbij sterk toe en was spoedig niet meer meetbaar, doordat de capillair van de viscosimeter verstopt raakte. Onder deze omstandigheden was het alleen tussen 20° en 40° C mogelijk om reproduceerbare viscositeitswaarden te verkrijgen.

Werd door toevoeging van een beperkte hoeveelheid zuur of base de potentiaal der soldeeltjes matig verhoogd (het sol bevond zich in het pH -gebied tussen 3,5 en 12,0), dan trad bij hogere temperaturen alleen een begin van aggregatie op. De stabiliteit der albuminedeeltjes was reeds zo sterk toegenomen, dat samensmelting tot grotere vlokken niet meer plaats had. Het was dan ook niet mogelijk om bij verhitting van een dergelijk sol een begin van coagulatie of opalescentie waar te nemen.

Bevatten de solen grotere hoeveelheden van een sterk zuur, dan bereikte de potentiaal der deeltjes zijn maximum waarde. De beginnende aggregatie werd totaal geremd en bleek zelfs in een peptisatie van het sol te kunnen overgaan (bij het sol Y was dit bijvoorbeeld het geval bij pH waarden tussen 1,8 en 2,6). De viscositeit van het sol, dat op 90° C verhit werd en daarna op 20° C werd afgekoeld, daalde namelijk tot onder de oorspronkelijke waarde. Dit effect trad op, onafhankelijk van de vroeger besproken daling der viscositeit, die door de ontledingsreactie werd veroorzaakt. Alle verkregen uitkomsten waren hiervoor reeds gecorrigeerd. In deze gevallen was het werkzame volume der soldeeltjes dus irreversieel afgenomen.

Werd het sol met een overmaat zuur bedeed, dan werd de potentiaalverhogende invloed der waterstofionen sterk tegengewerkt door de anionen, welke in hoge concentratie aanwezig waren. De potentiaal der albuminedeeltjes nam daarbij af, waardoor een beginnende aggregatie bij hogere temperaturen opnieuw mogelijk werd gemaakt. Dit bleek bij sol Y bij $pH = 1,5$ inderdaad het geval te zijn. Bij nog hogere waterstofionenconcentraties was het sol niet meer stabiel en trad bij verhitting opnieuw coagulatie op.

Nagegaan werd, of in alle zojuist besproken stabiliteitsgebieden der albuminesolen de wet van POISEUILLE werd gevolgd.

Hiertoe werd de viscositeit bepaald in een voor dit doel ontworpen viscosimeter. Deze kon met 10, 20 en 30 cm³ sol worden gevuld, waardoor de solmeniscus in het wijde been op verschillende hoogten kwam te staan, zodat de stroomsnelheid hiermede variërende waarden aannam. De methode, volgens welke deze bepalingen ten uitvoer werden gebracht, is uitvoerig door BUNGENBERG DE JONG (9) en door TENDELOO (14) beschreven.

In alle gevallen, waarin het mogelijk was, reproduceerbare viscositeitswaarden te verkrijgen, bleek tevens aan de wet van POISEUILLE te worden voldaan.

Als voorbeeld mogen de metingen dienen, uitgevoerd aan het sol Y. Bepaald werd de relatieve viscositeit van het sol, dat vooraf op de $pH = 3,9$ was gebracht (zie tabel 9).

TABEL 9

Gecorrigeerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$		
	Vulling van de viscosimeter in cm ³ :		
	10	20	30
20,01	0,039	0,040	0,039
40,00	0,041	0,042	0,042
60,02	0,047	0,047	0,045
80,24	0,049	0,048	0,047
$\frac{h}{l}$	1,08	0,83	0,59

Hierin geeft h aan de hydrostatiese druk en l de lengte van de capillair, zodat $\frac{h}{l}$ een maat is voor de stroomsnelheid.

De verkregen resultaten wezen er dus op, dat de aggregaten, die bij hogere temperatuur uit de albuminedeeltjes ontstonden, klein waren ten opzichte van de diameter van de capillair en geen veranderingen ondergingen ten gevolge van de vloeistofstroming.

Sterke afwijkingen van de wet van POISEUILLE werden vastgesteld onder die omstandigheden, waarbij deze aggregaten zich snel tot grotere deeltjes verenigden, zodat na enige tijd coagulatie van

het sol optrad. De vlokken, die uit de aggregaten ontstonden, werden door de vloeistofstroming nu en dan wel weer uitéengeslagen, maar gaven af en toe ook aanleiding tot een mechaniese verstopping van de capillair.

De resultaten met het sol X verkregen bij $pH = 4,5$ zijn samengevat in tabel 10.

TABEL 10

Gecorrigeerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$		
	Vulling van de viscosimeter in cm ³ :		
	10	20	30
20,01	0,033	0,032	0,032
29,91	0,035	0,035	0,034
40,00	0,040	0,044	0,043
50,26	0,095	0,100	0,121
$\frac{h}{l}$	1,08	0,83	0,59

Tabel 11 bevat de uitkomsten met het sol Y onder dergelijke omstandigheden ($pH = 5,0$) verkregen.

TABEL 11

Gecorrigeerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$		
	Vulling van de viscosimeter in cm ³ :		
	10	20	30
20,01	0,006	0,006	0,005
40,00	0,004	0,006	0,004
50,02	0,015	0,019	0,025

Met het isoelectriese sol Z ($pH = 4,8$) werden de waarden gevonden, die in tabel 12 zijn samengevat.

TABEL 12

Gecorrigeerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$		
	Vulling van de viscosimeter in cm³:		
	10	20	30
20,01	0,054	0,055	0,053
29,91	0,057	0,057	0,055
40,00	0,047	0,051	0,052
50,26	0,081	0,089	0,112

Om de verkregen resultaten onderling zo zuiver mogelijk te kunnen vergelijken, werden alle beschreven metingen verricht met één viscosimeter. Slechts voor de viscositeitsbepalingen aan ovalbumine-solen, welke aethylalkohol bevatten, werd een ander apparaat gebruikt (zie blz. 27).

Door het optreden van de besproken irreversiebele veranderingen in de solen was het dus niet mogelijk, bij de genoemde temperaturen een eventuele verandering in de hydratatiegraad der deeltjes viscosimetries vast te stellen. Daarom werd getracht, deze laatste te bepalen bij lagere temperaturen, waarbij mogelijk de invloed van de aggregatie der deeltjes meer op de achtergrond zou blijven. Zo werden metingen verricht tussen 0° en 20° C (tabel 13).

TABEL 13

Sol X.

Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$						
	pH						
	2,4	3,0	4,1	4,5	4,9-5,5	7,8	11,3
0,01	0,029	0,059	0,067	0,033	0,016	0,020	0,025
9,07	0,026	0,057	0,063		0,014		0,023
20,01	0,025	0,055	0,060	0,032	0,013	0,017	0,023

Sol Y.

Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$					
	<i>pH</i>					
	2,3	4,0	4,3	5,0	9,7	11,5
0,01	0,023	0,043	0,025	0,007	0,013	0,024
9,07	0,021	0,040	0,023	0,006	0,010	0,018
20,01	0,019	0,038	0,023	0,006	0,009	0,017

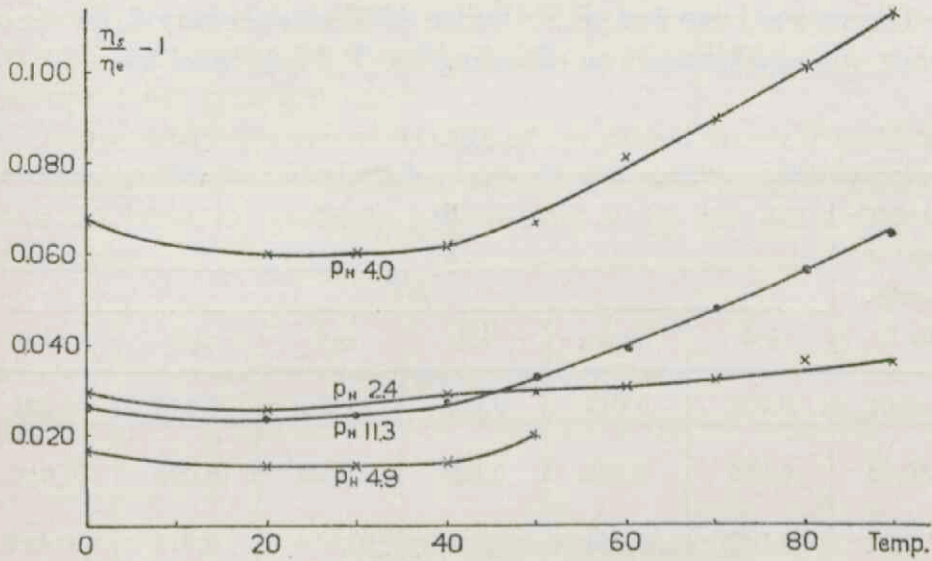


Fig. 3.

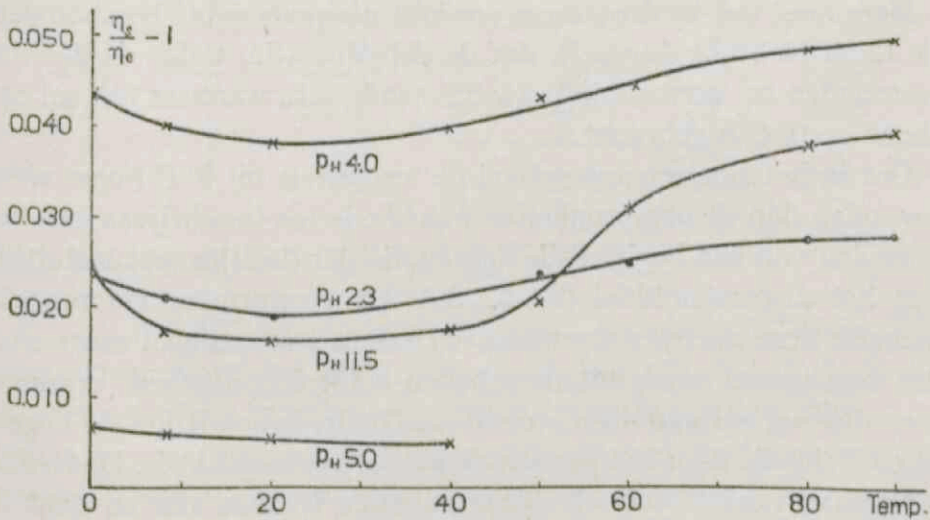


Fig. 4.

Zoals blijkt uit de figuren 3 en 4, daalde hier de viscositeit bij stijgende temperatuur. Op blz. 4 werd reeds aangegeven, dat dit moest worden toegeschreven aan een vermindering van het werkbare volume der albuminedeeltjes ten gevolge van een daling van de hydratatiegraad. Bij de beschouwingen omtrent de stabiliteit der ovalbuminesolen op blz. 15 werd de hydratatie der deeltjes dan ook niet besproken. Bij hogere temperaturen bleek deze sterk verminderd te zijn en dus als stabiliteitsfactor geen betekenis meer te bezitten.

Tevens werd van het sol Y, dat tot 40° C was verwarmd, de viscositeit opnieuw bepaald na afkoeling tot 0° C (zie tabel 14).

TABEL 14

Gecorrigeerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$					
	pH					
	2,3	4,0	4,3	5,0	9,7	11,5
0,01	0,023	0,043	0,025	0,007	0,013	0,024
↓						
40,00	0,022	0,039	0,024	0,005	0,008	0,018
↓						
0,01	0,023	0,044	0,032	0,010	0,015	0,023

Men moet het hydratatie-evenwicht als reversiebel beschouwen; uit tabel 14 blijkt dan ook, dat de dehydratatie, welke de deeltjes vertoonden bij verwarming, wordt opgeheven, wanneer het sol opnieuw op 0° C is gebracht.

Dat in het isoelectrische gebied de viscositeit bij 0° C hoger werd gevonden dan de oorspronkelijke waarde, is toe te schrijven aan het optreden van een beginnende aggregatie der deeltjes met insluiting van het dispersiemiddel (38, 62, 80). De verwarming veroorzaakt namelijk deze deeltjesvergroting, welke als irreversiebel moet worden beschouwd, zoals uit de tabellen 6 tot 8 is afgeleid. Wanneer men dus het sol van 40° C tot 0° C afkoelt, behoudt het de hogere viscositeit, die door het genoemde proces veroorzaakt is. De hydratatiegraad neemt weer de oorspronkelijke waarde aan en doet de viscositeit bij 0° C dus niet veranderen. Het totale effect is, dat het

sol na verwarming tot 40° C een enigszins grotere relatieve viscositeit vertoont.

De bij hogere temperaturen optredende dehydratatie, welke het verlies van één der twee stabiliteitsfactoren van het sol betekent (1), bevordert de aaneenlegging der albuminedeeltjes.

Het is begrijpelijk, dat dit proces het duidelijkst is waar te nemen, wanneer de pH van het sol ongeveer de waarde heeft van die van het isoelectrische punt.

Dan heeft ook de tweede stabiliteitsfactor, de potentiaal der deeltjes, zijn minimum bereikt, zodat de omstandigheden voor aggregatie het gunstigst zijn.

Tevens werd nagegaan of de solen in het gebied tussen 0° en 20° C de wet van POISEUILLE volgden. Dit bleek steeds het geval te zijn, zoals uit tabel 15, geldende voor het sol Y bij een $pH = 3,9$, is af te leiden.

TABEL 15

Gecorrigeerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$		
	Vulling van de viscosimeter in cm ³ :		
	10	20	30
0,01	0,043	0,045	0,043
9,07	0,040	0,040	0,039
20,01	0,039	0,040	0,038
$\frac{h}{l}$	1,08	0,83	0,59

Uit de viscositeitsmetingen aan de solen verricht bij constante temperatuur bleek, dat gelijktijdig met de potentiaal, de hydratatiegraad der deeltjes het kleinst is in het isoelectrische sol (15).

Door toevoeging van een zuur of base nam de hydratatie en parallel hiermede de viscositeit, toe tot een maximum waarde. De waarden, waaruit tabel 16 en figuur 5 zijn samengesteld, werden bepaald bij 20,01° C.

TABEL 16

Sol X		Sol Y	
pH	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$	pH	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$
2,4	0,025	1,2	0,008
3,0	0,055	1,5	0,013
4,1	0,060	1,8	0,017
4,5	0,032	2,3	0,019
4,9	0,013	2,6	0,033
6,5	0,015	4,0	0,038
7,8	0,017	4,3	0,023
11,3	0,023	5,0	0,006
		9,7	0,009
		11,5	0,018

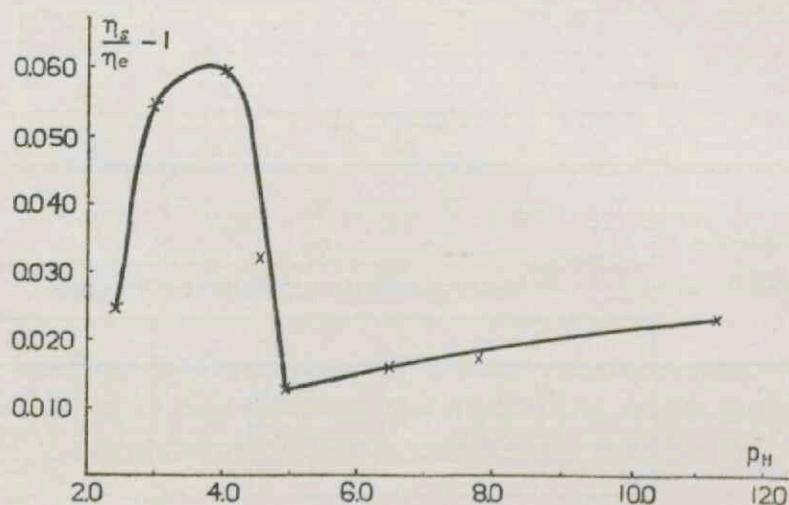


Fig. 5.

Men mocht dus verwachten, dat bij verwarming der solen de dehydratatie de grootste daling der viscositeit zou veroorzaken bij die waterstofionenconcentraties, waarbij de hydratatiegraad van de albuminedeeltjes hoog is. Inderdaad bleek dit juist te zijn, bij vergelijking van de experimenteel gevonden daling der viscositeitswaarden bij $pH = 4,1$ met die bij $pH = 4,9$ (tabel 13).

Uit het voorafgaande kan de gevolgtrekking gemaakt worden, dat de viscositeitscurven tussen 0° en 90° C op te vatten zijn als de

resultanten van twee verschillende processen, die naast elkaar verlopen, maar bij een bepaalde temperatuur ongelijke snelheid bezitten.

Bij lagere temperaturen blijft de aggregatie der albuminedeeltjes op de achtergrond, omdat de stabiliteit van het sol groot genoeg is, om deze reactie te remmen. De dalende hydratatie is dan duidelijk af te lezen uit de verandering der viscositeit. Dit verschijnsel zou, wanneer er geen secundaire reacties plaats hadden, zijn uitdrukking vinden in een viscositeit-temperatuurcurve (m in figuur 6), welke van 0° tot 90° C daalt. Deze reactie moet als het eigenlijke „denatureringsproces” van het ovalbumine worden beschouwd, zoals de hydratatievermindering der soldeeltjes in de literatuur meestal is genoemd.

Bij temperaturen boven 50° C is de dehydratatie reeds zo ver gevorderd, dat de deeltjes een aanmerkelijk deel van hun stabiliteit hebben verloren. Hierdoor wordt een aggregatie mogelijk, welke bij hogere temperaturen steeds sterker

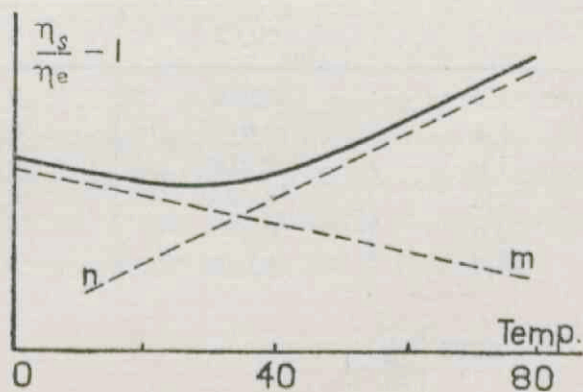


Fig. 6.

naar voren zal treden. Het werkzame volume der deeltjes neemt daarbij toe en de viscositeitscurve (η in figuur 6) zal een stijgend verloop vertonen naar de zijde der hogere temperaturen. De experimenteel gevonden curven zijn alle uit het verloop der lijnen m en η af te leiden. Beneden 40° C overheerst de invloed van de eerste; boven 50° C die der laatstgenoemde.

Wanneer de deeltjes een bepaalde potentiaal bezitten, zal het samenkleven worden tegengewerkt en wel sterker, naarmate de potentiaal hoger is. Uit de besproken grafieken is dan ook af te lezen, dat de stijging der viscositeit tussen 50° en 90° C kleiner wordt, naarmate het sol door toevoeging van een zuur of base meer is gestabiliseerd. Bij het sol Y bijvoorbeeld wordt de stijging van de viscositeit met de temperatuur merkbaar kleiner bij toenemende waterstofionenconcentratie in het sol.

Wordt het sol met een overmaat zuur bedeed, dan verminderen de zuuranionen, welke een hoge concentratie bereiken, de potentiaal-verhogende invloed, die de waterstofionen op het kolloïd uitoefenen.

De potentiaal en de hydratatie der deeltjes nemen daardoor af, zodat de beginnende aggregatie meer op de voorgrond treedt. Bij $pH = 1,2$ neemt de viscositeit voor het sol Y tussen 50° en 90° C dan ook meer toe dan bij $pH = 1,8$ (zie tabel 17 en figuur 7).

TABEL 17

pH	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$		$\Delta\eta$
	Gecorrigeerde temp. in C°		
	50,02	90,14	
1,2	0,016	0,020	0,004
1,5	0,017	0,019	0,002
1,8	0,019	0,021	0,002
2,3	0,024	0,028	0,004
2,6	0,033	0,043	0,010
4,0	0,043	0,049	0,006

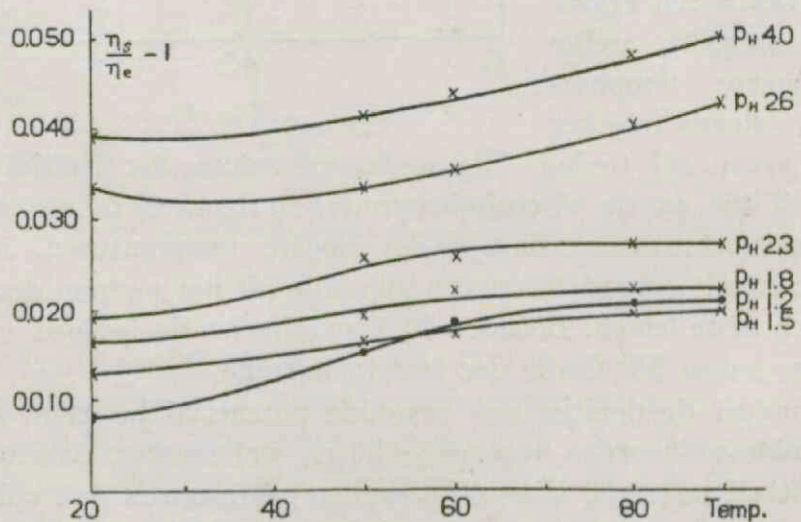


Fig. 7.

Daalt de pH beneden 1,0, dan treedt bij hogere temperaturen opnieuw uitvlokking van het sol op, zodat viscositeitsmetingen niet meer mogelijk zijn.

Merkwaardig is, dat de maximale stabiliteit van het sol, afgeleid uit de sterkste remming der optredende aggregatie, niet bij dezelfde pH wordt waargenomen, waarbij de viscositeit en de hydratatie der deeltjes hun maximum bereiken.

Ook de concentratie der albuminesolen oefent een merkbare invloed uit op de beginnende aggregatie. Het sol Z vertoonde de grootste albumine- en tevens de grootste electrolytconcentratie. Het sol was namelijk niet electries gedialyseerd. Het electrolytgehalte was dan ook aanmerkelijk hoger dan dat der solen X en Y. Dit was de oorzaak van de geringe stabiliteit van het sol Z. Bij hogere temperaturen trad steeds een zeer sterke aggregatie op, zodat de viscositeitscurve een steil verloop vertoonde. Het sol Y was te beschouwen als een viervoudige verdunning van het sol X, terwijl de electrolytconcentratie ervan nog verder werd verlaagd door lang voortgezette electrodialyse. De stabiliteit van het sol Y was dan ook groter dan die van het sol X, wat bleek uit de geringe mate, waarin aggregatie der deeltjes bij hogere temperaturen optrad.

Vergelijkt men van beide solen de viscositeitscurven bij dezelfde pH , dan kan men bij het sol X een aanmerkelijk sterkere stijging met de temperatuur waarnemen dan bij het sol Y (tabel 18).

TABEL 18

Gecorrigeerde temp. in C°	pH	Sol X		Sol Y		Sol Z	
		$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$	$\Delta\eta$	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$	$\Delta\eta$	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$	$\Delta\eta$
50,26	2,4	0,029	0,008	0,024	0,001	0,095	0,104
90,14		0,037		0,025		0,199	
50,26	4,0	0,062	0,050	0,043	0,006		
90,14		0,112		0,049			

HOOFDSTUK IV

Viscositeitsmetingen aan gedehydrateerde ovalbuminesolen

Nu het verloop der viscositeitsveranderingen bij verwarming van ovalbuminesolen is verklaard, wordt het mogelijk, daaruit verdere eigenschappen van dit systeem af te leiden. Met behulp van het voorafgaande kan men onder meer nagaan, welke invloed aethylalkohol op de viscositeit zal uitoefenen. Wanneer aethylalkohol in hogere concentraties in het sol aanwezig is, worden de albumine-deeltjes gedehydrateerd, waardoor het sol een stabiliteitsfactor verliest.

Een dergelijk proces moet zich kenbaar maken door een vermindering van de relatieve viscositeit ten opzichte van het dispersiemiddel.

KRUYT en BUNGENBERG DE JONG (1) voerden bij 45° C viscositeitsbepalingen uit aan verschillende agarsolen, waarin de concentratie van de agar steeds dezelfde waarde had, maar waaraan aethylalkohol in verschillende hoeveelheden was toegevoegd.

De gevonden viscositeiten werden betrokken op water-alkoholmengsels, waarin de alkoholconcentraties overeenkwamen met die in de gemeten solen.

De resultaten, die een half uur en 24 uur na de menging werden verkregen, zijn vermeld in tabel 19.

De waarden, welke in de kolommen 4 en 5 zijn opgenomen, vormen een maat voor de hydratatie der deeltjes. Deze bleek in het gebied, waarin de alkoholconcentratie 40 tot 60 gew. % bedroeg, plotseling zeer sterk af te nemen.

TABEL 19

Gewichts- proc. alkohol	$\frac{\eta_{s+a}}{\eta_{w+a}}$		$\frac{\eta_{s+a}}{\eta_{w+a}} - 1$	
0	1,309	1,306	0,309	0,306
40,6	1,272	1,269	0,272	0,269
52,1	1,149	1,146	0,149	0,146
65,0	1,018	1,017	0,018	0,017

Tevens verdwijnt hiermede de invloed, welke de lijn m (in figuur 6) uitoefent op het verloop van de viscositeitscurve tussen 0° en 90° C. De relatieve viscositeit zal dus in het genoemde gebied continu toenemen met de temperatuur.

Van het sol Y werd de relatieve viscositeit bepaald, nadat het met verschillende hoeveelheden aethylalkohol was bedeed. Deze alkohol was door destillatie gezuiverd. Door toevoeging van de benodigde hoeveelheid 0,1 N zoutzuur werd het sol op de $pH = 4,0$ gebracht, waarna de volgende mengsels werden bereid.

- I. Aan 10 cm^3 van het sol werden 10 cm^3 tweemaal gedestilleerd water toegevoegd.
- II. 10 cm^3 van het sol werden bedeed met 10 cm^3 van een mengsel van gelijke volumina aethylalkohol 96 % en tweemaal gedestilleerd water.
- III. 10 cm^3 van het sol werden vermengd met 10 cm^3 aethylalkohol 96 %.

Door de hoge viscositeit der water-alkoholmengsels was het niet mogelijk, om dit gedeelte van het onderzoek uit te voeren met dezelfde viscosimeter, welke bij de tot nu toe besproken metingen in gebruik was geweest. Wel werden alle in dit hoofdstuk beschreven bepalingen uitgevoerd met één apparaat.

Tabel 20 en figuur 8 geven een overzicht van de verrichte waarnemingen.

TABEL 20

Gecorrigeerde temp. in $^\circ\text{C}$	$\frac{\eta_s}{\eta_i} - 1$		
	I (zuiver sol)	II (sol + 24% alk.)	III (sol + 48% alk.)
0,01	0,011	0,007	0,025
20,01	0,009	0,013	0,032
40,00	0,016	0,021	0,037
60,02	0,018	0,024	0,040

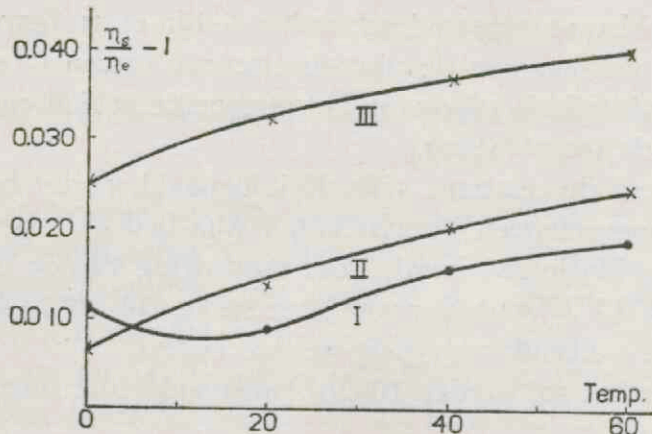


Fig. 8.

De curven ver-
liepen, zoals ver-
wacht mocht wor-
den: van de meng-
sels II en III was
de viscositeit bij
0,01° C kleiner
dan die bij 20,01°
C. Bovendien lag
deze waarde bij
0° C voor het
mengsel II lager
dan die voor het

zuivere sol in dezelfde verdunning. De hogere viscositeit van het laatstgenoemde sol moet dus inderdaad worden toegeschreven aan een sterkere hydratatie der albuminedeeltjes.

Bij stijgende temperatuur verliepen de curven der alcoholhoudende solen steiler dan die van het zuivere sol. In het eerste geval werkten namelijk twee dehydraterende factoren op de deeltjes in: de verwarming en de alcohol. Ook zal bij een bepaalde temperatuur de dehydratatie der alcoholhoudende solen sterker zijn, naarmate de alcoholconcentratie hoger is. De stabiliteit der deeltjes wordt dan kleiner, zodat de aggregatie wordt vergroot. Bij een ovalbumine-sol, dat 24 % aethylalkohol bevatte, was de relatieve viscositeit bij 0° C kleiner dan die van het zuivere sol bij dezelfde temperatuur. Een geringe verwarming van het eerstgenoemde sol was echter voldoende om de aggregatie zo sterk te doen toenemen, dat de viscositeit boven die van het zuivere sol uitsteeg; bij 20° C was dit reeds het geval.

Bij een sol met 48 vol. % aethylalkohol was deze neiging tot samenkleaving der eiwitdeeltjes zoveel sterker geworden, dat de gehele curve aanmerkelijk verschoof naar hogere viscositeitswaarden. Bij temperaturen tussen 0° en 60° C overtrof daardoor de viscositeit van dit sol die van het sol, dat geen alcohol bevatte.

Vervolgens werd een meer verdund ovalbuminesol onderzocht. Van het sol Y werden telkens 10 cm³ (met een *pH* = 4,0) als volgt verdund:

I. Toegevoegd werden 30 cm³ tweemaal gedestilleerd water.

- II. Toegevoegd werden 20 cm³ tweemaal gedestilleerd water en 10 cm³ aethylalkohol 96 %.
- III. Gemengd werd met 10 cm³ tweemaal gedestilleerd water en 20 cm³ aethylalkohol 96 %.
- IV. Gemengd werd met 30 cm³ aethylalkohol 96 %.

De relatieve viscositeiten van deze mengsels zijn weergegeven in tabel 21 en figuur 9.

TABEL 21

Gecorri- geerde temp. in C°	$\frac{\eta_s}{\eta_i} - 1$			
	I	II	III	IV
	(zuiver sol)	(sol + 24% alk.)	(sol + 48% alk.)	(sol + 72% alk.)
0,01	0,010	0,005	0,006	0,016
20,01	0,007	0,007	0,010	0,017
40,00	0,013	0,009	0,016	0,020
60,02	0,018	0,015	0,019	0,022
80,24	0,020	0,023	0,024	

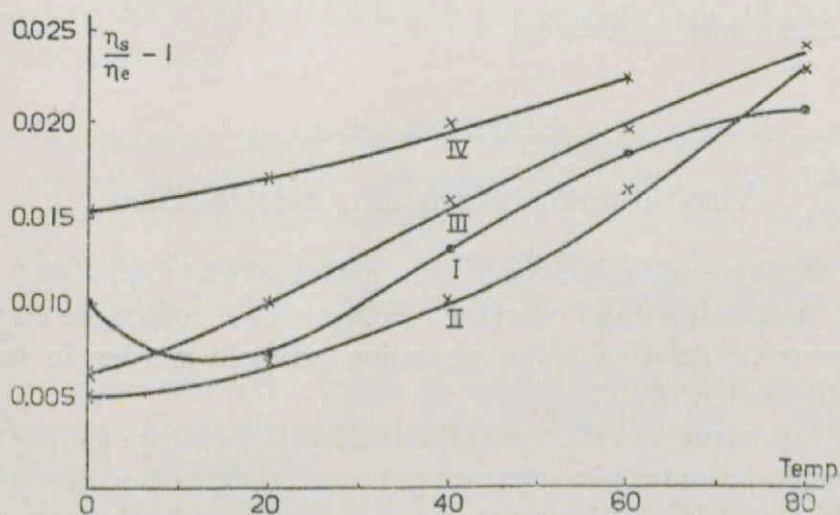


Fig. 9.

In dit sol waren de concentraties van het albumine en van de nog aanwezige electrolyten tot op een vierde der oorspronkelijke waarden gedaald. De stabiliteit der deeltjes was daardoor aanmer-

kelik vergroot. De aggregatie werd bij hogere temperaturen zo sterk geremd, dat bij mengsel II de dehydratatie (door de alcohol veroorzaakt) duidelijk bleek uit de viscositeit.

Deze was tussen 0° en 60° C lager dan die van het zuivere sol, dat dezelfde ovalbumineconcentratie bezat (I). Pas bij $80,24^{\circ}$ C werd een geringe aggregatie bemerkbaar.

Voor het mengsel III verliep de curve analoog; de dehydratatie was hier echter zoveel sterker en de stabiliteit van het sol zo gering, dat de aggregatie merkbaar optrad bij 20° C. Toch kon bij dit mengsel uit de metingen afgeleid worden, dat de hydratatie der albuminedeeltjes bij 0° C kleiner was dan in het zuivere sol bij dezelfde temperatuur.

Wanneer het albuminesol 72 vol. % aethylalkohol bevatte [mengsel IV], was de stabiliteit zo ver gedaald, dat overal tussen 0° en 90° C aggregatie der deeltjes optrad. De viscositeitscurve kwam daardoor geheel boven die van het normale sol (I) te liggen.

De resultaten, welke met de alkoholhoudende ovalbuminesolen werden verkregen, beantwoordden geheel aan de verwachting. De verklaringen voor het gedrag van de solen bij verwarming, zoals deze in het vorige hoofdstuk werden opgesteld, vonden hierdoor een uitnemende bevestiging.

HOOFDSTUK V

Viscositeitsmetingen aan gelatinesolen

Bij vroegere onderzoeken was gebleken, dat bijna geen gelatine in de soltoestand overging, wanneer sterk gedroogde en niet voorgeweekte gelatineblokjes plotseling gebracht werden in water van 90° tot 100° C.

Ter verklaring van dit verschijnsel werd het analoge gedrag van ovalbuminesolen tot uitgangspunt gekozen. Aangenomen moest dan worden, dat ook bij gelatinesolen de hydratatie bij hogere temperaturen verminderde.

Wanneer de pH zich bevond in de buurt van het isoelectrische punt, zouden de gelatinedeeltjes na de verwarming niet meer in staat zijn, om een stabiel sol te vormen. Beide stabiliteitsfactoren, potentiaal en hydratatie, zouden dan uitgeschakeld zijn.

Getracht werd een inzicht te verkrijgen in de zich afspelende reactie, door de relatieve viscositeiten te bepalen van gelatinesolen, welke volgens verschillende methoden waren verkregen.

Van handelsgelatine werd een 60 % gel bereid. Dit werd tot kuben gevormd en gedurende drie maanden gedroogd bij 35° tot 40° C in een droogkast met luchtcirculatie.

Het verkregen product werd tot kuben gezaagd (met ribben van 2 cm), welke gedurende 12 uren bij 0° C werden voorgeweekt in 100 cm³ gedestilleerd water.

Zij werden daarna met gedestilleerd water gedurende 30 minuten op 60° C verwarmd, waardoor solen met variërende gelatineconcentraties gevormd werden.

Van deze controlesolen werd de relatieve viscositeit gemeten bij 40° C in afhankelijkheid van de gelatineconcentratie.

Tevens werd bepaald de verlaging, die de viscositeit per minuut onderging bij 100° C; deze werd als maatstaf voor de irreversiebele ontleding van de gelatine gebruikt.

De waterstofionenconcentratie van de solen kwam overeen met een pH van 5,2.

Als relatieve maat voor de gelatineconcentratie werd de refractie der solen bij 40° C tot in 5 decimalen nauwkeurig bepaald met een dompelrefractometer.

Niet voorgeweekte blokjes van de sterk gedroogde gelatine werden plotseling gedompeld in 500 cm³ gedestilleerd water van 100° C. Na 7½, 15 en 30 minuten werd een blokje uit het water genomen en na afkoeling tot een gelatinesol verwerkt op de reeds beschreven wijze. Soms werd hiertoe uitsluitend de kern van het blokje gebruikt.

De viscositeit der solen kwam, na correctie voor de opgetreden ontledingsreactie, steeds overeen met de waarden, die verkregen waren met de controle-solen.

De buitenkant der blokjes was door de inwerking van het warme water merkbaar gezwollen, de kern niet.

Tevens werden de gelatineconcentratie en de viscositeit gemeten van de solen, gevormd door oplossing van de buitenkant der gelatineblokjes, wanneer deze in water van 100° C werden verwarmd. Steeds werden kuben van 4 g gelatine gebracht in 500 cm³ gedes-

tilleerd water van 100° C. De resultaten van de waarnemingen zijn samengevat in tabel 22.

TABEL 22

Tijd van verwarming op 100° C in minuten	Niet voorgeweekte gelatine		Gelatine gedurende 1½ uur voorgeweekt bij 20° C	
	$\frac{\eta_s}{\eta_w} - 1$	n_D^{40}	$\frac{\eta_s}{\eta_w} - 1$	n_D^{40}
7½	0,034	1,33083	0,070	1,33105
15	0,102	1,33134	0,149	1,33148
30	0,170	1,33153	0,214	1,33177

De peptisatiesnelheid der gelatine bleek dus door de sterke droging aanmerkelijk te zijn verminderd. Voor het vermoeden, dat de gedroogde gelatine bij 100° C gedehydrateerd zou worden, op de wijze als dit bij het ovalbumine was vastgesteld, werd niet de geringste aanwijzing gevonden.

Dergelijke negatieve resultaten werden ook verkregen door SPIEGEL-ADOLF (16).

ALEXANDER (17) schrijft aan gelatine, welke op 120° C is verhit geweest, verminderde oplosbaarheid toe. Waarschijnlijk is hier een daling van de peptisatiesnelheid bedoeld, zoals ook in bovenstaande proeven werd gevonden.

Uit hun onderzoekingen menen SHEPPARD (18) en zijn medewerkers te mogen afleiden, dat in gelatine slechts ongeveer 0,6 % van het gewicht aan eiwitten aanwezig zijn, welke coagulatie bij verwarming vertonen.

HISTORIES GEDEELTE

HOOFDSTUK VI

Oudere literatuur

Als karakteristiek kenmerk voor de coagulatie van verhitte eiwitsolen gold vroeger het ontstaan van veranderde, in water onoplosbare produkten, welke niet meer in de natieve eiwitten konden worden omgezet. Oudere onderzoekingen over het mechanisme van dit proces hebben vaak geringe betekenis, omdat de gebruikte solen van ongedefinieerde aard waren en niet voldoende electrolytvrij waren bereid. Vaak werden onderzocht mengsels van eiwitten met zeer verschillende chemiese en kolloïdchemiese eigenschappen.

De mogelijkheid bestaat echter, dat ook in het met vele voorzorgen bereide „gekristalliseerde” albumine [SÖRENSEN (5)] het eiwit niet als één component moet worden opgevat. In het licht der onderzoekingen van BUNGENBERG DE JONG (19) over coacervatieverschijnselen, rijst de vraag, of deze soms essentieel zijn voor het proces van „omkristalliseren”, waardoor de albuminen in het algemeen gezuiverd worden.

Vroegere onderzoekers, die de coagulatie bestudeerden, werden vooral getroffen door het feit, dat voor verschillende natieve eiwitten de temperatuur, waarbij uitvlokking optrad, niet dezelfde was. FRÉDÉRIQUE (20) en HEWLETT (21) vatten het „coagulatiepunt” dan ook op als een physiese constante en gebruikten het ter onderscheiding van eiwitten. Later bleek, dat de electrolytconcentratie der solen de uitvlokking sterk beïnvloedde, zodat de genoemde temperatuur niet als een karakteristieke grootheid kon worden beschouwd. [LIEBERKÜHN (22)]. BRÜCKE, NEUMEISTER en LIMBOURG (23) stelden vast, dat een volledige precipitatie slechts plaats vond in zwak zure solen. Toegevoegde neutrale zouten be-

vorderden in het algemeen de uitvlokking. Door dialyse gelukte het aan ARONSTEIN (24) en SCHMIDT (25) om de zouten uit albuminesolen grotendeels te verwijderen. Dergelijke eiwitten, welke als electrolytvrij beschouwd werden, vertoonden geen coagulatie bij verhitting. Werd echter een weinig van een neutraal zout toegevoegd, dan trad het verschijnsel opnieuw op, zodra de temperatuur tot 60° C werd opgevoerd.

Vele auteurs [SCHMIDT, ARONSTEIN, HEYNSIUS (26), KIESERITZKY (27), ROSENBERG (28), LEPESCHKIN (29)] huldigden daarom de opvatting, dat een gezuiverd eiwitsol bij verwarming niet uitvlokte. De experimenten van HARDY (30, 35) en PAULI komen daarmee niet overeen. Zij toonden aan, dat een electrolytvrij eiwit juist een minimum van stabiliteit vertoonde. MICHAELIS (31, 53, 69, 95, 113) wees daarbij op het feit, dat dit minimum bij verschillende eiwitten optrad bij pH -waarden, welke in het algemeen afweken van die van het neutrale punt. Op het minimum (het „isoelectrische punt”) was de concentratie der kationen, welke door de ampholyt werden afgesplitst, gelijk aan die der gevormde anionen. Dit punt bleek van belang te zijn bij de verklaring der eigenschappen van eiwitsolen. Week de waterstofionenconcentratie in dergelijke solen af van die van het genoemde punt, dan verkregen de eiwitdeeltjes een bepaalde potentiaal, welke positief was voor kleinere, negatief voor grotere pH -waarden.

PAULI (32) wees er tevens op, dat in solen, welke gedurende korte tijd werden gedialyseerd, de waterstofionenconcentratie vaak aanmerkelijk kleiner was dan met de isoelectrische waarde overeenkwam. De eiwitdeeltjes bezaten daardoor een negatieve potentiaal. Werden de solen verhit en werd de hydratatiegraad dus sterk verlaagd, dan resteerde één stabiliteitsfactor, zodat geen uitvlokking optrad [FREUND en LUSTIG (33)].

Overeenkomstige verschijnselen werden waargenomen, wanneer de solen gedialyseerd werden, zonder bijzondere voorzorgen in acht te nemen. Door bacteriële inwerking ontstonden basiese stoffen, welke de pH der solen sterk verhoogden.

Niet slechts ARONSTEIN en HEYNSIUS gebruikten dergelijke basiese solen. De genoemde bezwaren moeten eveneens tegen de onderzoeken van MICHAELIS (31, 53, 69, 95, 113) en zijn medewerkers worden aangevoerd.

Zij bereidden de solen uit serum, dat met ammoniumsulfaat half werd verzadigd. De globulinen precipiteerden dan en werden door filtratie verwijderd. Het filtraat werd gedialyseerd, waarbij de verschillende zoutionen niet gelijktijdig konden worden verwijderd door verschillen in de diffusiesnelheid. Dit was de oorzaak, dat het sol gedurende de dialyse een vrij sterk basiese reactie ging vertonen en niet coaguleerde bij verwarming of bij toevoeging van aethylalkohol. Tevens trad in dergelijke eiwitsolen bij hogere temperaturen een tamelijk sterke chemiese ontleding op, zoals SÖRENSEN en JÜRGENSEN vaststelden (zie blz. 41).

Het punt, waarbij maximale uitvlokking optrad, was slechts te bereiken door toevoeging van een aanzienlike hoeveelheid zuur.

MICHAELIS oordeelde een dialyse van het serum gedurende 5 tot 10 dagen voldoende, om de aanwezige electrolyten geheel te verwijderen. Op analoge wijze dialyseerde PAULI zijn solen gedurende 52 dagen en verkreeg eiwitten, welke een aanzienlijk lagere coagulatietemperatuur vertoonden.

Wanneer men daarbij overweegt, dat een potentiaalverandering der deeltjes noodzakelijk een variatie der hydratatie van het eiwit ten gevolge moet hebben, dan is het duidelijk, dat de besproken bezwaren ook aan de viscositeitsmetingen van MICHAELIS hun betekenis ontnemen. Bovendien verminderen neutrale zouten de relatieve viscositeit aanmerkelijk. Dit effect trad op, zodra aan de verkregen basiese solen zuur werd toegevoegd ter neutralisatie.

PAULI hield hiermede rekening en wees op de betekenis van een intense zuivering der eiwitten. In latere tijd werd hiertoe de electrodialyse door hem aanbevolen, waarmede prakties electrolytvrije eiwitten konden worden bereid (34).

Uit de proeven van WICHMANN, CHICK en MARTIN (zie blz. 50) is af te leiden, dat bij verwarming van eiwitsolen het *water* de karakteristieke veranderingen der eiwitdeeltjes mogelijk maakt.

De theoretiese beschouwingen, welke in de literatuur voorkomen omtrent het mechanisme van het proces, zijn in twee hoofdgroepen te verdelen. Verscheidene onderzoekers menen als verklaring voor de „denaturering” van verwarmde eiwitten te moeten aannemen, dat de deeltjes water hebben afgestaan. Anderen denken hierbij aan een wateropname.

In beide gevallen kan nog onderscheiden worden de wijze, waarop

het watergehalte veranderd is. Men kan hiervoor een chemies proces verantwoordelijk achten of een kolloïdchemiese verklaring aannemen.

Volgens de eerstgenoemde zienswijze zal het waterverlies toegeschreven worden aan een condensatie der polaire groepen van het eiwit; de wateropname aan hydrolyse. Kolloïdchemies opgevat, komen de processen overeen met een dehydratatie, resp. hydratatie der eiwitdeeltjes.

HOOFDSTUK VII

Het „denatureringsproces” opgevat als wateronttrekking

Vele auteurs spraken de overtuiging uit, dat de veranderingen, welke eiwitten bij verhitting vertoonden, veroorzaakt werden door een vermindering van het watergehalte der deeltjes.

Oudere onderzoekingen, welke op deze mogelijkheid wezen, werden uitgevoerd door HARDY (30). Hij ging de omstandigheden na, waaronder solen van verwarmd kippeneiwit bestendig waren. Bij een waterstofionenconcentratie, gelijk aan die van het isoelectrische punt, trad steeds uitvlokking op; alleen zure en basiese solen waren stabiel. Bij electrophorese bleek, dat de eiwitdeeltjes in zure solen een positieve potentiaal, in basiese een negatieve potentiaal hadden verkregen. Uitvlokking trad op, wanneer het eiwit teruggebracht werd op het isoelectrische punt of door toevoeging van neutrale zouten. Electrophoreties kon dan geen bepaalde potentiaal der deeltjes meer worden vastgesteld.

Bij de coagulatie door neutrale zouten bleek de valentie der kationen belangrijk te zijn voor de ontlading van negatieve solen; de anionen oefenden dan een geringe invloed uit. Omgekeerd was het karakter der anionen beslissend voor de grenswaarde, waarbij positieve eiwitten uitvloekten, terwijl de kationen dan van secundair belang waren. De invloed van de valentie der tegengesteld geladen ionen was geheel overeenkomstig aan die, welke bij suspensoiden werd vastgesteld.

Bij verhitting van isoelectrische eiwitten ontstonden aggregaten der deeltjes, welke snel ultramicroscopische zichtbaarheid be-

reikten. Waren de solen vooraf door zuur of base gestabiliseerd, dan trad geen begin van uitvlokking op.

De coagulatie bij verwarming werd daarom in twee processen onderscheiden. Als eerste produkt werd een irreversiebel kolloïd gevormd door dehydratatie („desolution”).

Daarbij vormden zich aggregaten der eiwitdeeltjes, welke een stabiel sol vormden of uitvlokten, afhankelijk van de potentiaal, die zij bezaten.

Ten onrechte kwamen HARDY en WHETHAM (35) op tegen HOFMEISTER's (36) theorie, welke de uitvlokkende werking van electrolyten in hoge concentraties toeschreef aan hun wateronttrekkende kracht. Niet-electrolyten, welke deze eigenschap eveneens bezaten, zouden dan óók coagulerend moeten werken op eiwitten. De genoemde onderzoekers ontkenden dit, daar een gekookt, maar stabiel, eiwitsol volstrekt niet uitvlokte bij toevoeging van een overmaat alkohol. Hieruit blijkt slechts, dat de stabiliteit van het onderzochte sol niet afhing van de hydratatie der deeltjes. Het experiment was dus niet in strijd met HOFMEISTER's hypothese, maar duidde aan, dat het oorspronkelijk gehydrateerde eiwit reeds bij het koken was gedehydrateerd.

PAULI (32) onderzocht natieve eiwitten en kwam daarbij in verzet tegen HARDY's theorie, welke de stabiliteit der solen uitsluitend toeschreef aan de potentiaal der deeltjes.

Bij electrophorese van gedialyseerde eiwitsolen bleek deze potentiaal een minimumwaarde te kunnen aannemen, terwijl de solen stabiel bleven ten opzichte van uitvlokkende electrolyten.

De natieve eiwitten bezitten dus een tweede stabiliteitsfactor, welke aan PAULI toen nog onbekend was. Later bleek het belang der *hydratatie* voor de stabiliteit van hydrophiele kolloïden.

PAULI (11, 37, 55, 64, 109) en HANDOVSKY (38) vestigden er de aandacht op, dat eiwitten bij verhoging der potentiaal door een toegevoegde base of zuur, tevens een vergroting der hydratatie vertoonden. Deze effecten werden teweeggebracht door de waterstof- of hydroxylionen; ook aan de tegengesteld geladen ionen werd echter een belangrijke rol toegekend. Zwavelzuur bleek bijvoorbeeld nauweliks in staat te zijn, om de potentiaal en hydratatie der eiwitdeeltjes te verhogen, wat aan de invloed der bivalente sulfaat-ionen moest worden toegeschreven (39). De werkzaamheid van het

zuur was echter betrokken op de *toegevoegde* concentraties. LOEB(40) leverde hierop kritiek; hij schreef de variërende invloed van verschillende zuren uitsluitend toe aan de bereikte *pH*.

Met zijn nieuwere onderzoekingen paste PAULI zich bij deze gedachtengang aan; de werking der tegengesteld geladen ionen was daarom niet minder duidelijk vast te stellen.

Bij toevoeging van een overmaat zuur of base bereikten de tegengesteld geladen ionen een zo hoge concentratie, dat zij de potentiaal en hydratatie van het eiwit verlaagden. Het was daardoor mogelijk om reeds bij kamertemperatuur het eiwit te precipiteren. PAULI en WAGNER (41) bepaalden de grenswaarden van gedialyseerd runderserum voor verschillende zuren bij variërende temperatuur. De concentratie, waarbij na 24 uren opalescentie optrad, was het kleinst voor trichloorazijnzuur, het grootst voor zoutzuur (tabel 23).

TABEL 23

Zuur	Grenswaarden in aequivalenten bij		
	3,5° C	18° C	36° C
<i>HCl</i>	0,6	0,4	0,3
<i>H₂SO₄</i>	0,6	0,2	0,2
<i>CHCl₂ · COOH</i>		0,1	0,05
<i>CCl₃ · COOH</i>	0,05	0,04	0,03

De uitkomsten wijzen er op, dat de stabiliteit en dus tevens de hydratatie van het eiwit daalde bij verwarming. Bij de hoogste temperatuur werden immers aanzienlijk kleinere grenswaarden gemeten dan bij 3,5° C.

Op het isoelectrische punt bereikte de hydratatie van het eiwit een minimum, dat bij de albuminen echter boven de kritische waarde lag. Ook bij isoelectrische reactie bleven deze eiwitten dus gepeptiseerd, in tegenstelling met de globulinen. Werden de solen echter verhit of met een overmaat alcohol bedeed, dan verkregen zij een volkomen hydrophoob karakter. Deze overwegingen leidden PAULI

en SPIEGEL-ADOLF tot de gevolgtrekking, dat de uitvlokking van eiwitten door verhoging der temperatuur of door alcohol, op een dehydratatie moest berusten (42, 43, 129).

Door een korte verwarming precipiteerden de eiwitten wel, maar de chemiese eigenschappen bleven vrijwel onveranderd. Ter verklaring van het „denatureringsproces” konden ingrijpende chemiese reacties dan ook niet dienen. Aangenomen werd, dat bij verhitting optrad een zuuramide-condensatie tussen de amino- en carboxylgroepen, waarbij water vrijkwam en het aantal hydrophiele plekken der eiwitdeeltjes verminderde.

In de meer recente publicaties werd aan het sterk gezuiverde isoelectrische albumine een structuur toegeschreven van polyvalente „Zwitterionen” en een daarmee samenhangende hydratatie (44). Men moet het sol echter niet als een iondispers systeem beschouwen, waarin het eiwit als „Zwitterion” aanwezig is. De deeltjes in het sol zijn polymoleculair en bezitten aan hun oppervlak een „Zwitterion”-structuur. Deze geeft in zure en basiese solen aanleiding tot de vorming van een dubbellaag, die de deeltjes stabiliseert [KRUYT (45)].

In analogie met de eigenschappen van kongokleurstofsolen beschouwde PAULI een overgang der „Zwitterionen” in de neutrale toestand als het begin der coagulatie van eiwitten door verhitting of door alcohol. Daarna zou tevens dehydratatie optreden, waardoor een reactie tussen meerdere positieve en negatieve groepen mogelijk werd. Als gevolgen hiervan zouden de anhydridevorming en de aggregatie der deeltjes beschouwd moeten worden. Bij deze aaneenlegging schenen aminozuren als koppeling te kunnen fungeren. Bij toevoeging van deze stoffen aan ovalbuminesolen werd de coagulatietemperatuur tenminste merkbaar verlaagd [PAULI en LAMBRECHTS (46)].

Verschillende auteurs overwogen de waarschijnlijkheid, dat bij verwarming van eiwitten uitsluitend een chemiese omzetting van deze stoffen plaats vond (47, 117). De aanleiding hiertoe vormde het veranderde gedrag der verhitte solen ten opzichte van nitroprusside-natrium, in ammonia opgelost. Natieve solen bevatten geen vrije thiolgroepen en vertoonden met het reagens dan ook geen kleur-

reactie. Werd echter een 2 procentig ovalbuminesol gedurende 5 minuten op 100°C verhit, dan viel de reactie positief uit. Dit leek een aanwijzing te zijn, dat bij de „denaturering” bepaalde zwavelatomen in thiolgroepen waren overgegaan. In solen, welke vóór de verwarming half verzadigd werden met natriumsalicylaat of natriumpyrofosfaat, traden uitvlokking en kleurreactie met nitroprussidenatrium niet op. Werd het toegevoegde zout echter na de verhitting verwijderd door electrodialyse, dan coaguleerde het sol. Het eiwit was dus in een hydrophobe toestand overgevoerd, maar reageerde niet met het genoemde reagens. Bij precipitatie van eiwitten met alcohol traden analoge verschijnselen op. Ook BANCROFT (63) kwam tot het resultaat, dat gedehydrateerde eiwitten soms een positieve, soms een negatieve kleurreactie gaven met nitroprussidenatrium. MASTIN en SCHRIJVER (48) stelden bij verhit albumine steeds een ontbreken der kleuring vast. Uit proeven van ARNOLD en HARRIS verkrijgt men eveneens de indruk, dat het nitroprussidenatrium slechts een gevoelig reagens is voor het aantonen van een opgetreden hydrolyse van het eiwit (47, 49).

HARRIS wilde een dergelijk proces dan ook uitsluitend als „denaturering” beschouwen. In dat geval moet men er zich echter rekenschap van geven, dat verschillende invloeden de kolloïdchemische eigenschappen van het eiwit kunnen veranderen, voordat enige wijziging in de chemische samenstelling van de stof aantoonbaar is.

Uit de omstandigheden, waaronder een positieve reactie met het nitroprussidenatrium wordt verkregen, kan men afleiden, dat het eiwit dan reeds een secundaire chemische omzetting heeft ondergaan. Dit is bijvoorbeeld het geval, wanneer ovalbumine wordt uitgevlokt met $0,2\text{ N}$ zwavelzuur. Het eiwit wordt dan irreversieel in een hydrophobe toestand overgevoerd en tevens gedeeltelijk gehydrolyseerd.

SCHORR heeft het verloop van deze chemische reactie bij verhoging der temperatuur vastgelegd door viscositeitsmetingen (50). Bij basiese serumeiwitten bleek de relatieve viscositeit bij 14°C aanmerkelijk groter te zijn dan bij $24,5^{\circ}\text{C}$. Tevens was de maximumwaarde, welke de viscositeit bij variatie van de pH verkreeg, bij 14°C groter dan bij $24,5^{\circ}\text{C}$ (tabel 24).

Nog werd opgemerkt, dat de viscositeit der basiese solen na de toevoeging van loog gedurende korte tijd steeg, tot het evenwicht

TABEL 24

NaOH- concentratie	$\frac{\eta_s}{\eta_e} - 1$ bij 14° C	$\frac{\eta_s}{\eta} - 1$ bij 24,5° C
0	0,112	0,111
0,025	0,175	0,140
0,050	0,350	0,330
0,083	0,391	0,325
0,250	0,356	0,309

was ingetreden. Daarna trad een regelmatige daling in, welke parallel verliep met de chemiese ontleding van het eiwit. Verhoging der temperatuur versnelde deze reactie aanzienlijk (zie blz. 9).

Bij overeenkomstige onderzoeken maakten SÖRENSEN en JÜRGENSEN (51) gebruik van de formoltitratiemethode, om het aminozuurgehalte te bepalen in de intermicellaire vloeistof van verhitte ovalbuminesolen. Zij stelden vast, dat de hoeveelheid titreerbare materie voortdurend toenam met de duur der verwarming en onafhankelijk was van een eventuele coagulatie van het sol. Terecht werd aangenomen, dat bij hogere temperaturen twee reacties gelijktijdig verliepen: een uitvlokking van het eiwit en een hydrolyse, welke leidde tot het in oplossing gaan van een gedeelte der gecoaguleerde stof.

De bij een verschillende duur der verwarming verkregen uitkomsten werden geëxtrapoleerd naar de tijd 0 (dit is het ogenblik, waarop de temperatuur van 100° C werd bereikt). Zij werden daardoor ongeveer gelijk aan de gemiddelde proeffout.

De eigenlijke „denaturering” was vrijwel onafhankelijk van de duur der verhitting en verliep bij 100° C in het isoelectrische sol zeer snel. Bij dit proces werden de stikstofhoudende derivaten dus niet afgesplitst. De in de filtraten getitreerde stoffen ontstonden bij een secundaire ontleding van het eiwit door het warme water. Deze hydrolyse werd sterker, naarmate de verhitting langer duurde en naarmate er meer eiwit geprecipiteerd was. Aan het isoelectrische punt vertoonde de hydrolysesnelheid een minimumwaarde, terwijl in zure en basiese solen een aanmerkelijke snelheidsvergroting werd vastgesteld.

Ter controle werden metingen verricht aan solen, welke met een overmaat aethylalkohol waren bedeed. Het eiwit vlokke dan wel uit, maar er bestond geen reden om aan te nemen, dat bij 15° C de alkohol het eiwit chemies zou aantasten. Het resultaat, dat een analyties aantoonbare hoeveelheid der ontledingsprodukten niet aanwezig was, stemde hiermede overeen (129).

De onderzoekers constateerden tevens, dat bij de coagulatie van aangezuurde solen de *pH* toenam. Blijkbaar werd een aanzienlijke hoeveelheid der waterstofionen door het neerslag geadsorbeerd (52). De anionenconcentratie varieerde daarbij niet. Daar de auteurs het eiwitsol als een moleculairdispers systeem beschouwden, was het hun niet mogelijk om dit verschijnsel te verklaren.

Hier zal een selectieve adsorptie der waterstofionen hebben plaats gevonden, terwijl door uitwisseling andere, oorspronkelijk aan het eiwit geadsorbeerde ionen, werden vrijgemaakt.

MICHAELIS en RONA (53) meenden als verklaring te moeten aannemen, dat bij verwarming het in de solen opgeloste koolzuur ontweek. Dit bleek niet het geval te zijn; ook in solen, welke geheel koolzuurvrij waren, verminderde de waterstofionenconcentratie bij verhitting.

Uit coagulatieproeven leidde SÖRENSEN af, dat de uitvlokkingsnelheid van „gekristalliseerd” ovalbumine op het isoelectrische punt een maximum waarde bereikte, terwijl de dehydratatiesnelheid daar juist gering was. De laatstgenoemde snelheid nam echter sterk toe, parallel met de waterstofionenconcentratie in het sol. Werden een zuur en een isoelectrisch sol gedurende dezelfde tijd op 100° C verhit, dan bleek al het eiwit in het zure milieu te zijn gedehydrateerd, terwijl van het isoelectrische albumine nog een aanzienlijke hoeveelheid in de hydrophiele toestand verkeerde.

Tevens werden experimenten uitgevoerd, welke een kwantitatief inzicht moesten geven in het vraagstuk der hydratatieverandering bij verwarming van het eiwit.

SÖRENSEN trachtte de samenstelling van het verkregen coagulum te bepalen uit vergelijkende analyses van het neerslag met de aanhechtende moederloog en van het filtraat, dat door verwijdering van het precipitaat ontstond. Voor ovalbumine, gepeptiseerd in een ammoniumsulfatoplossing, werd de hoeveelheid „gebonden” water bepaald op 0,35 g per 1 g watervrij eiwit. Deze hoeveelheid

werd gemeten als water, dat niet beschikbaar was voor het oplossen van het in het sol aanwezige zout. De verkregen uitkomsten waren constant bij zoutconcentraties, welke tussen 10 % en 25 % varieerden.

Bovendien werd een isoelectries sol van „gekristalliseerd” ovalbumine uitgevlokt, door het gedurende korte tijd, onder schudden, op 100° C te verhitten. Nadat het evenwicht tussen de vloeistof en het neerslag was ingetreden, werden analyses uitgevoerd op analoge wijze als bij het natieve eiwit geschiedde. De hoeveelheid „gebonden” water werd nu vastgesteld op 0,17 g per 1 g watervrij eiwit. Bij de verwarming was dus een gedeelte van het hydratatiewater door het eiwit afgestaan. Uit de waarnemingen werd tevens afgeleid, dat het verhitte eiwit nog steeds enig „gebonden” water bevatte en dus niet *totaal* gedehydrateerd was. Eiwit, dat door alcohol werd uitgevlokt, bleek minder gehydrateerd te zijn dan het door koken verkregen coagulum.

Behalve door een dehydratatie van het eiwit, zouden de verkregen resultaten nog verklaard kunnen worden door een toename van de hoeveelheid ammoniumsulfaat, welke door het eiwit werd geadsorbeerd. Experimenteel kon echter worden vastgesteld, dat bij een verhitting der solen de hoeveelheid geadsorbeerde electrolyt daalde. In ieder geval had dus een dehydratatie van het eiwit plaats. Om te bepalen in hoeverre de verkregen waarden afhankelijk waren van de grootte der zoutadsorptie, werden de proeven herhaald met glucose, welke stof slechts weinig geadsorbeerd werd. De resultaten kwamen overeen met die, welke met ammoniumsulfaat waren verkregen.

Opgemerkt moet worden, dat deze metingen geen kwantitatief inzicht verschaffen in de hydratatie der zuivere eiwitten. Zij wijzen uitsluitend op een relatieve verandering der hoeveelheid „gebonden water” in solen, welke opgeloste stoffen bevatten.

Later pasten WEBER en VERSMOLD GORTNER's methode (54) toe ter bepaling van de hoeveelheid gebonden water van ovalbumine („Nichtlösender Raum”) (55). Door metingen van de vriespuntsdaling bepaalden zij van toegevoegde niet-electrolyten de concentratie in de intermicellaire vloeistof en in het sol. Het verschil tussen de gevonden waarden was een maat voor de hoeveelheid water, welke door het kolloïd gebonden was.

De metingen werden verricht aan een ovalbuminesol, dat met stoffen was bedeed, welke verschillend sterk geadsorbeerd werden (glucose, glycerine). De gebruikte concentraties werden zodanig gevarieerd, dat het gebied bereikt werd, waar de geadsorbeerde hoeveelheden vrijwel constant waren.

De hoeveelheid door 1 g ovalbumine „gebonden” water werd met glucose vastgesteld op 0,25 g; na coagulatie van het eiwit door verwarming was deze waarde gedaald tot 0,16 g. Ook in kwantitatief opzicht bestaat er dus een goede overeenkomst met de door SÖRENSEN verkregen resultaten (blz. 42).

ROBERTSON's opvattingen omtrent de „denaturering” van eiwitten kwamen overeen met die van PAULI; ten dele voerde hij daarvoor echter andere motieven aan. ROBERTSON (56) baseerde zijn theorie op onderzoeken, waarbij caseinogeen, gepeptiseerd in mierenzuur, uitgevlokt werd met cuprichloride. Hierbij kwam hij tot de gevolgtrekking, dat dehydratatie kon worden veroorzaakt door verwarming en door toevoeging van electrolyten of niet-electrolyten met waterbindend vermogen. De gevolgen van dit proces konden zijn coagulatie of hernieuwde peptisatie. In dit laatste geval zal een verhoging van de potentiaal der deeltjes of solvatatie door een toegevoegde stof de stabilisatie veroorzaakt hebben. Enig verband tussen het besproken proces en de uitvloeking van natieve eiwitten bij verhitting werd echter niet aangegeven.

Bij verwarming van sterk gedroogd albumine op 120° C gedurende enige uren bleek, dat er onder die omstandigheden geen sprake was van dehydratatie. Dit leidde tot de conclusie, dat water voor deze reactie onmisbaar was. Bij de aanwezigheid ervan zouden de eindstandige amino- en carboxylgroepen in staat zijn om ionen af te splitsen en met elkaar onder amidevorming te reageren.

Metingen van HENDERSON en RYDER (57) wezen er op, dat de *hydrolyse* van eiwitten een exotherme reactie was. Uit het principe van VAN 'T HOFF en LE CHATELIER meende ROBERTSON (58) dan te kunnen afleiden, dat een verhoging der temperatuur het verlopen van de condensatiereactie (dehydratatie van het eiwit) bevorderde. Hierbij is de vraag gewettigd, of de bepalingen der hydrolyse-warmte met voldoende nauwkeurigheid geschieden. Het warmte-effect is slechts gering en voor de verschillende secundaire reacties,

die gelijktijdig verlopen, zijn niet de nodige correcties aangebracht. Het is dus minder gewenst, om aan de gepubliceerde resultaten theoretiese beschouwingen vast te knopen.

De invloed van verhitting op eiwitsolen beschouwde ALEXANDER als een gedeeltelijke verwijdering van de beschermende waterlaag, welke rondom de deeltjes aanwezig was (59). Bij botsingen tussen de laatstgenoemden werd het dan mogelijk, dat aanwezige rest-valenties op elkaar inwerkten en aggregatie der deeltjes veroorzaakten. Een chemiese reactie (condensatie) scheen de auteur niet het essentiële proces der denaturering te zijn; wel zou een dergelijke omzetting als nevenreactie kunnen optreden.

Een overeenkomstige uitspraak werd door HOPKINS (60) gedaan, die evenmin bewijzende experimenten aanvoerde. Naast een verschuiving der kolloïdchemiese eigenschappen van hydrofiel naar hydrofob, constateerde hij een verandering der bindingen van de zwavelatomen in het verwarmde eiwit. Hij trachtte deze aan te tonen met de nitroprussidenatrium-reactie, waarvan de onbetrouwbaarheid reeds werd besproken (blz. 39). Regelmatig bleef de kleur dan ook uit, wanneer het reagens aan verhitte *serumeiwitten* werd toegevoegd. Slechts nadat deze met een reductiemiddel waren behandeld, was het mogelijk, om een positieve kleurreactie te verkrijgen. De op deze wijze aangetoonde thiolgroepen kan men echter moeilijk als een indicatie voor het „denatureringsproces” beschouwen.

LOEB beschreef het typiese gebeuren bij de verwarming van eiwitsolen als volgt (61). Door de verhitting trad een verandering in het „gekristalliseerde” ovalbumine op, waardoor de attractie tussen de „eiwitmoleculen” onderling groter werd dan die tussen het eiwit en de watermoleculen. Wanneer de deeltjes geen potentiaal bezaten, verenigden zij zich, zodat uitvlokking optrad. Dit was uitsluitend te verhinderen, door aan de deeltjes een bepaalde potentiaal mede te delen.

Tevens werd in eiwitsolen, met zeer lage pH waarden, een potentiaaldaling waargenomen, veroorzaakt door adsorptie der aanwezige anionen (62). Door metingen der relatieve viscositeit werd de aggregatie der deeltjes vastgesteld bij verschillende temperaturen. De waterstofionenconcentratie werd constant gehouden en kwam overeen met een pH van 0,85. Bij 10° C varieerde de viscositeit nauwe-

liks met de tijd, terwijl bij 35° C reeds na 1 uur de experimenten moesten worden beëindigd door het verstopt raken van de capillair (zie tabel 25).

TABEL 25

Tijd in uren	Relatieve viscositeit bij		
	10° C	24° C	35° C
0	1,1	1,2	1,5
1	—	—	9,0
2	1,1	1,6	—
4	1,2	2,0	—
6	1,2	3,5	—
7	—	5,1	—
8	—	6,8	—
21	1,5	—	—

De dehydratatie bij hogere temperaturen versterkte de uitvlokkende werking der anionen dus zodanig, dat de stabiliteit der solen opgeheven werd.

BANCROFT en RUTZLER (63) splitsten de veranderingen, welke eiwitsolen bij verhitting vertoonden, in twee groepen.

De irreversiebele reactie werd als de eigenlike „denaturering” beschouwd, terwijl het reversiebele proces werd aangezien voor een uitvlokking van het gevormde produkt. Geëxperimenteerd werd echter met kippeneiwit, zodat de verkregen resultaten betrekking hebben op een mengsel van verschillende eiwitstoffen. De auteurs achtten dit geen bezwaar, omdat zij aannamen, dat bij verdunning het aanwezige ovoglobuline totaal zou precipiteren. Uit de bereidingsmethode, welke PAULI (64) volgde, bleek, dat deze opvatting onjuist was. Zelfs na dialyse konden in dergelijke solen nog sporen globuline worden aangetoond.

Hoewel geconstateerd was, dat zuivere aether het eiwit bij kamertemperatuur dehydrateerde, zodat na enige dagen uitvlokking optrad, werden ook proeven beschreven, waarbij met aether geëxtraheerde solen vrijwel niet precipiteerden door verhitting op 100° C gedurende 20 minuten. Zeer waarschijnlijk werd het eiwit wel gedehydrateerd, maar was door de speciale behandeling van het sol de

coagulatiesnelheid zozeer verminderd, dat binnen de waarnemings-tijd geen zichtbare uitvlokking optrad.

De onderzoekers meenden, dat door de extractie een stof verwijderd werd, welke de precipitatie bij verwarming van het kolloïd zou veroorzaken. De genoemde stof werd beschouwd als een adsorptieprodukt van een vet aan lecithine, welke stoffen in het kippeneiwit voorkwamen. Hieruit blijkt reeds, dat de gegeven verklaring van het proces niet voor ovalbumine gelden kan. In goed gezuiverde albuminesolen treden de besproken verschijnselen niet op, daar lecithinen en globulinen dan totaal ontbreken [SPIEGEL-ADOLF (114)].

FREUND, LUSTIG (33) en LEPESCHKIN (65) onderzochten met aether behandelde albuminesolen, welke bij verhitting dan ook steeds uitvlokking vertoonden. Zelfs werd door RAMSDEN (86) coagulatie bij kamertemperatuur vastgesteld.

BANCROFT en RUTZLER kwamen tot de volgende conclusies. Bij verwarming der solen werd een kolloïde stof, aan welke het albumine zijn stabiliteit ontleende, vernietigd. Hierbij was er geen sprake van enige chemiese omzetting van het eiwit zelf. De besproken bezwaren ontnemen de eerstgenoemde gevolgtrekking zijn waarde. Bovendien werd de pH der solen niet gemeten; kleine variaties daarvan kunnen de coagulatie van het eiwit sterk hebben beïnvloed.

Overeenkomstige kritiek kan uitgeoefend worden op de bepaling der „viscositeitsveranderingen” van een coagulerend eiwitsol. OSTWALD (66) bepaalde de doorlooptijden van het sol bij stijgende temperaturen en stelde een regelmatige daling der waarden vast. Bij $57,5^{\circ} \text{C}$ nam de doorlooptijd plotseling sterk toe, kort voordat de eerste troebeling zichtbaar werd. Bij iets hogere temperatuur werd een maximum bereikt, waarna een scherpe daling intrad. De curve van het gevormde hydrophobe sol verliep dan verder geheel als die van het stabiele sol tussen 20° en 57°C . De aggregatie der deeltjes, bij $57,5^{\circ} \text{C}$ beginnende, zal aanleiding gegeven hebben tot een gedeeltelijke verstopping der capillair van de viscosimeter. Hierdoor wordt de toename van de doorlooptijd verklaarbaar.

Er werden echter geen relatieve viscositeiten gemeten, terwijl de waterstofionenconcentratie van het sol ook onbekend was. Het experiment geeft dus geen aanwijzingen omtrent eventuele hydratatieveranderingen van het eiwit.

MICHAELIS en MOSTYNSKI (69) meenden, dat albuminesolen bij verwarming van het emulsoïde type overgingen in het suspensoïde type. De hoge viscositeit en de lage oppervlakte-energie der verhitte eiwitten wezen echter nog op hun hydrophiel karakter. Deze stoffen werden dan ook beschouwd als een overgang tussen de hydrophobe en hydrophiele kolloïden.

Nauwkeuriger dan door P. S. LEWIS (67) geschied was, werden eventuele variaties in het aantal titreerbare groepen van verhitte eiwitten nagegaan door BOOTH (70). Hij verkreeg hierbij negatieve resultaten, hoewel de methodiek zozeer was verfijnd, dat een geringe verandering in de structuur der dissocieerbare groepen duidelijk aantoonbaar zou zijn geweest. Het „denatureringsproces” kon dus niet als een hydrolyse der imide-bindingen worden opgevat. Bovendien bleken de genoemde bindingen zeer bestendig te zijn, zelfs ten opzichte van hydrolyserende reagentia.

Reeds HIRSCH-POGANY (71) had dergelijke onderzoeken verricht; zij kwam daarbij tot analoge uitkomsten.

BOOTH waakte er met veel zorg voor, dat de toegevoegde zuren en basen het eiwit niet reeds bij kamertemperatuur „denatureerden”, zoals bij het haemoglobine vaak het geval bleek te zijn (72). Hij maakte daarom gebruik van „gekristalliseerd” ovalbumine, dat bij pH waarden groter dan 1,75, geen „denaturering” vertoonde bij 25° C.

De veranderingen, welke bij verwarming van het eiwit optraden, werden toegeschreven aan omzettingen der „Zwitterionen”, welke aan het oppervlak der deeltjes voorkwamen. Hierin werd tevens een verklaring gezien voor het gemak, waarmede dergelijke solen coaguleerden. Deze verschuivingen in de groepering der polaire groepen waren vanzelfsprekend door kwantitatief analytische bepalingen niet aan te tonen. Voor de irreversibiteit van het „denatureringsproces” kon geen verklaring worden gegeven (zie hoofdstuk X).

LEPESCHKIN beschouwde de „denaturering” als een chemiese reactie van het eiwit met water (73, 97). Zuren versnelden het proces sterk, zoals hij uit het volgende experiment afleidde. Een gedialyseerd ovalbuminesol, waarin 0,8 procent ammoniumsulfaat aanwezig was, vertoonde bij 63° C een bepaalde „denatureringstijd”. Deze laatste grootheid werd voorgesteld door de tijd, die het sol

nodig had om een bepaalde graad van ondoorzichtigheid te bereiken. Werd een concentratie van slechts 0,00016 N salpeterzuur ingesteld, dan daalde de genoemde grootheid tot de helft der oorspronkelijke waarde.

Door de toevoeging van het zuur verkregen de eiwitdeeltjes echter een positieve potentiaal. Het tweewaardige, negatieve sulfation werd daardoor sterk geadsorbeerd en verlaagde de potentiaal der deeltjes meer dan in het isoelectrische sol het geval was. Bij deze proeven speelden dus de *potentiaalveranderingen* der deeltjes een eerste rol.

Voor de onderzoeker was de invloed van kleine hoeveelheden zuur een aanleiding om het „denatureringsproces” met de hydrolyse van suikers te vergelijken. Deze opvatting scheen versterkt te worden door het feit, dat in basiese solen de „denatureringssnelheid” vrijwel onveranderd bleef en onafhankelijk was van de aard der toegevoegde zouten. Hiertoe werd echter de invloed van verschillende kaliumzouten nagegaan.

De auteur nam niet in aanmerking, dat in basiese solen het eiwit een negatieve potentiaal had verkregen, zodat kationen de gemeten snelheid in de eerste plaats beïnvloedden. Deze grootheid varieerde dus weinig, omdat uitsluitend kaliumionen werden toegevoegd.

In sterker basiese solen werd zelfs een vermindering van de snelheid vastgesteld. In een dergelijk milieu treedt echter een toename op van de secundaire ontleding van het eiwit, welke tot in water oplosbare produkten voert. Dit kan de vergroting van de hoeveelheid coagulum verhinderen, zoals door SÖRENSEN, JÜRGENSEN en SCHORR werd vastgesteld (zie blz. 41).

LEPESCHKIN verzuimde om hiervoor een correctie in rekening te brengen. In zeer geconcentreerde electrolytoplossingen meende hij wel een dehydratatie van het eiwit te moeten aannemen. Het zo verkregen precipitaat bleek bij verwarming sneller „gedenatureerd” te worden dan het natieve eiwit. Dit is in tegenspraak met de hypothese, volgens welke de „denaturering” uit een hydrolytisch proces zou bestaan.

De vergroting van de snelheid der uitvloeking bij de toevoeging van alcohol, aether of chloroform werd ook aan de *dehydraterende* werking van deze stoffen toegeschreven.

De tegenstrijdigheid in de besproken opvattingen werd door

LEPESCHKIN opgeheven, toen hij later ook aan het *verhitte* albumine een hydrophoob karakter toekende (74).

Tegen de gevolgdde methodiek kan nog ingebracht worden, dat door onvoldoende dialyse de albuminesolen vaak geen isoelectrische reactie vertoonden. Bij verhitting trad dan geen coagulatie op (75). Bovendien werd verzuimd om de waterstofionenconcentratie in de solen te bepalen.

HOOFDSTUK VIII

Het „denatureringsproces” beschouwd als wateropname

Onder de auteurs, die de opvatting huldigden, dat bij verwarming van eiwitsolen water door de deeltjes werd *opgenomen*, nemen CHICK en MARTIN een belangrijke plaats in. Zij onderscheidden twee reacties: de eigenlijke „denaturering” en de daaropvolgende uitvlokking (76). Van PAULI, HANDOVSKY en SCHORR (zie blz. 37 en 40) werd overgenomen, dat de isoelectrische eiwitten door toevoeging van zuren of basen een grotere hydratatie verkregen.

Proeven van WICHMANN (77) werden herhaald met overeenkomstig resultaat. „Gekristalliseerd” ovalbumine werd gedroogd en daarna gedurende 5 uren op 120° C verhit. Bij het in water brengen bleek de peptisatiesnelheid niet te zijn veranderd. Werd het albumine echter op gelijke temperatuur verhit in stoom, dan werd het ogenblikkelijk „gedenatureerd”. Het water was voor deze omzetting blijkbaar onontbeerlijk. Hierdoor kwamen de onderzoekers tot de gevolgtrekking, dat het besproken proces verliep onder opname van water door het eiwit.

De sterke toename der relatieve viscositeit van gestabiliseerde solen, welke na de verhitting dus geheel gepeptiseerd bleven, werd reeds door hen opgemerkt. De auteurs meenden hierin een aanwijzing te mogen zien voor een vergrote hydratatie van het eiwit. Op blz. 23 werd echter uiteengezet, dat het effect aan een aggregatie der deeltjes moet worden toegeschreven.

Door CHICK en LUBRZYNSKA (78) werden relatieve viscositeitsmetingen verricht aan solen van „gekristalliseerd” ovalbumine en serumalbumine tussen 0° en 40° C. Bij hogere temperaturen zouden

deze bepalingen geen zin gehad hebben, daar volgens de onderzoekers dan „denaturering” van het sol was opgetreden.

De verkregen waarden waren kleiner, naarmate zij bij een hogere temperatuur werden bepaald. Deze daling van de viscositeit nam toe, parallel met de concentratie van het eiwit. De resultaten, welke op blz. 19 werden medegedeeld, bevinden zich hiermede in uitstekende overeenstemming.

Deze uitkomsten werden verklaard met de hypothese, dat bij hogere temperaturen minder water ter peptisatie van het eiwit nodig zou zijn, dan bij 0° C. Als een overeenkomstig geval werd beschouwd de toename der oplosbaarheid in moleculairdisperse systemen bij stijgende temperatuur. Het verschijnsel werd dan ook niet in verband gebracht met de „denaturering”, welke bij verwarming optrad.

Een nadere bevestiging van hun opvatting meenden CHICK en MARTIN te hebben gevonden in het feit, dat zowel toegevoegde zuren als basen de snelheid der „denaturering” vergrootten. Bij de metingen was echter de invloed der reagentia op de coagulatiesnelheid niet uitgeschakeld, zodat aan de verkregen uitkomsten weinig betekenis kan worden toegekend. Bovendien werden de bepalingen slechts verricht aan de basiese zijde van het isoelectrische punt. Bij een gemiddelde loogconcentratie trad een snelheidsminimum op; het eiwit was daar dus gestabiliseerd, wat aanduidde, dat niet uitsluitend *hydrolyse* kon zijn opgetreden. De mate der „denaturering” en de hydratatiegraad der deeltjes veranderden dus volstrekt niet parallel met elkaar, zoals de auteurs meenden te hebben aangetoond.

De experimenten, welke CLARK (79) verrichtte met solen van „gekristalliseerd” ovalbumine leverden uitkomsten op, die geheel overeenkwamen met PAULI's bevindingen. Hoe meer de waterstof-ionenconcentratie der solen zich verwijderde van de isoelectrische waarde, des te hoger werd de potentiaal der deeltjes. Zure of basiese solen bleven na verhitting dan ook veelal stabiel; werd echter daarna de *pH* gebracht op de waarde 4,8, dan trad uitvlokking in. Dit wees er op, dat het eiwit door de verwarming een dehydratatie had ondergaan en daardoor hydrophobe eigenschappen had verkregen (zie blz. 36).

De resultaten van relatieve viscositeitsmetingen brachten CLARK er toch toe, om als eerste phase van het „denatureringsproces” een hydratatie aan te nemen. Deze zou door een dehydratatie gevolgd worden in de gevallen, waarin de solen coaguleerden.

De bepalingen werden uitgevoerd aan een 2 procentig sol bij de pH 6,0, zodat na de verwarming geen uitvlokking intrad. Werd het sol daarna afgekoeld tot de oorspronkelijke temperatuur, dan vertoonde het een grotere relatieve viscositeit dan het natieve eiwit. Door toepassing van EINSTEIN's berekening (zie blz. 8) kwam men tot de gevolgtrekking, dat het eiwit gedurende de verhitting een hogere hydratatiegraad bereikte.

BUNGENBERG DE JONG stelde evenwel vast, dat hydratatie-evenwichten reversiebel zijn (blz. 2).

Was het door CLARK gevonden effect door haar juist geïnterpreteerd, dan kon in het verwarmde en weer afgekoelde sol geen veranderde viscositeit zijn vastgesteld. Bij afkoeling van 100° tot 15° C zou de oorspronkelijke hydratatiegraad van het eiwit zich opnieuw hebben ingesteld, waardoor de relatieve viscositeit tot de beginwaarde zou zijn teruggekeerd.

Bij hogere temperaturen trad echter een aggregatie der gedehydrateerde eiwitdeeltjes op, zodat de viscositeit toenam. Dit proces was irreversiebel; na de afkoeling van het sol tot kamertemperatuur konden de gevolgen ervan dus nog worden geconstateerd (38, 62, 80). In dit geval kwam de vergrote viscositeit dus niet overeen met een verhoogde hydratatiegraad van het eiwit. Bovendien blijkt ook uit de stabiliteitsveranderingen, welke verhitte albuminesolen ondergaan bij toevoeging van neutrale zouten, dat deze solen een hydrophoob karakter bezitten.

Analoge proefnemingen werden verricht door LOUGHLIN en W. C. Mc C. LEWIS (128). Ook zij constateerden, dat de viscositeit van gestabiliseerde ovalbuminesolen toenam bij verhoging der temperatuur. Door de verwarming veranderde het volume van het sol niet, zoals dilatometries werd vastgesteld. De vergroting van het werkzame volume der eiwitdeeltjes werd daarom toegeschreven aan een opname van water door het albumine. Het resultaat van de toepassing der formules van EINSTEIN en VON SMOLUCHOWSKI (8) was, dat een vermeerdering van de hoeveelheid „gebonden” water bij verhitting van het eiwit werd gevonden. Deze verandering werd be-

schouwd als een verhoging van de hydratatiegraad, daar W. C. Mc C. LEWIS reeds vroeger uit onderzoekingen van P. S. LEWIS had afgeleid, dat de „denaturering” van verwarmde eiwitten niet als een hydrolyse kon worden opgevat (67,68). De tegenstrijdigheid, welke bestaat tussen deze resultaten en die van SÖRENSEN en WEBER, is begrijpelijk in het licht der bedenkingen, welke tegen CLARK's opvattingen werden ingebracht.

De besproken afhankelijkheid der viscositeit van de aggregatietoestand der deeltjes, werd door SCHOORL (81) gebruikt om de uitvlokking van kippeneiwit viscosimetries te volgen.

De stof werd met zoveel zoutzuur bedeed, dat langzame coagulatie optrad. De doorlooptijd, welke bij 15° C werd bepaald, steeg regelmatig met de tijd, terwijl het sol volkomen helder bleef. De „viscositeit” nam plotseling snel toe, wanneer in het sol een begin van uitvlokking zichtbaar werd. Spoedig daarna raakte de capillair dan verstopt door de gevormde aggregaten, zodat de metingen beëindigd moesten worden.

In CLARK's solen trad alleen de eerste phase der hier beschreven uitvlokking op.

WU en YEN WU constateerden het verlopen van twee reacties bij de „denaturering” van eiwitten (82,110). Een verandering in de moleculaire structuur van het albumine werd waargenomen, terwijl tevens de grootte der deeltjes toenam. De laatstgenoemde verandering zou de geringe stabiliteit der verwarmde solen ten opzichte van neutrale zouten veroorzaken.

Het eerstgenoemde proces werd vergeleken met de omzetting, welke albumine bij kamertemperatuur onderging, wanneer zuren of basen in overmaat werden toegevoegd. Het bindingsvermogen van het eiwit voor de in het sol aanwezige stoffen werd dan groter, terwijl tevens een hydrolytische splitsing van het albumine optrad.

In de „denaturering” bij verwarming zagen de auteurs een geheel overeenkomstig geval. Zij meenden ook dan met een hydrolyse van zeer labiele bindingen in het eiwitmolecule te doen te hebben. Inderdaad werden de ovalbuminesolen gedurende de metingen omgezet in in water oplosbare produkten. Het toegevoegde natriumhydroxyde (0,05 N) werkte ontledend; tyrosine, tryptophaan, am-

moniak en zwavelwaterstof werden afgesplitst. Bij verwarming trad geen coagulatie van het eiwit op, zelfs niet na neutralisatie van het sol; een feit, waarvan WU geen verklaring gaf.

De kleurreactie van verhit eiwit met het reagens van FOLIN-DENIS (83) [een mengsel van fosformolybdeenzuur en fosforwolfraamzuur], welke zou aanwijzen of „denaturering” had plaats gehad, bleek volstrekt niet specifiek te zijn. MASTIN en REES (48, 84) verwarmden ovalbumine zeer voorzichtig, zodat wel coagulatie optrad, maar hydrolyse zoveel mogelijk voorkomen werd. Nadat het neerslag was afgefiltreerd, werd onderzocht, welke stikstofderivaten in het filtraat voorkwamen. Bij geen enkele proef kon tyrosine worden aangetoond, noch met FOLIN-DENIS' reagens, noch met dat van MILLON.

Adsorptie van tyrosine aan het gevormde coagulum was hiervan niet de oorzaak, zoals door controleproeven werd aangetoond. Ook met verwarmde zure en basiese solen werden negatieve resultaten verkregen. In deze gevallen werd geen neerslag gevormd, dat tyrosine adsorberen en aan de aantoning onttrekken kon. Het door WU gebruikte reagens gaf steeds een negatieve aanwijzing, hoewel het eiwit grotendeels gedehydrateerd was.

In hoofdstuk II werd reeds vastgesteld, dat bij verwarming van ovalbumine naast dehydratatie ook hydrolyse van het eiwit kon optreden. Het laatstgenoemde proces kan echter moeilijk als karakteristiek gelden voor een omzetting, waarbij juist hydrophobe stoffen ontstaan. Bovendien zal bij een voorzichtige verwarming van het albumine vrijwel geen ontleding aantoonbaar zijn (51).

Uit de experimenten van CHICK en MARTIN (blz. 50) werd door de auteurs afgeleid, dat water een voor de „denaturering” onmisbare factor is. Wanneer de reactie overeenkwam met een dehydratatie van het eiwit, dan zou dit laatste bij droge verhitting het hydratatie-water eveneens moeten verliezen. De stof zou daarna in water niet meer te peptiseren zijn. De genoemde proeven bewezen het tegendeel, zodat WU een *toename* der hydratatie bij verwarming meende te moeten aannemen.

De mogelijkheid, dat de laatste resten van het gebonden water door het albumine, ook bij verhitting, hardnekkig worden vastgehouden, werd door hem niet overwogen. Door stoom werd albuminepoeder namelijk bij 100° C snel „gedenatureerd”. Volgens de auteur

waren deze omstandigheden geheel gelijk aan die, welke door CHICK en MARTIN waren beschreven. In beide gevallen zou de omzetting in een vast systeem zijn verlopen, terwijl dehydratatie uitgesloten was. Uit deze beschouwingen blijkt, dat WU zich een onjuiste voorstelling heeft gevormd van de toestand, waarin het gebonden water der eiwitten verkeert.

Analoge bezwaren kunnen ingebracht worden tegen een publicatie van HENDRIX en WILSON (85), die door titrimetrische bepalingen de verschillen tussen natief en verhit ovalbumine trachtten vast te stellen. De verkregen uitkomsten wezen er op, dat natief eiwit meer zuur of base bond dan het verwarmde albumine. Bij deze proeven was echter de mogelijkheid, dat het gecoaguleerde eiwit chemies was omgezet, niet uitgesloten.

Het isoelectrische eiwit werd gedurende een half uur in stoom op 100° C verhit, wat een onnodig langdurige behandeling lijkt. Het hierbij optredende secundaire hydrolyseproces kan een variatie van de pH veroorzaken, welke ten onrechte aan een veranderde electrolytadsorptie van het eiwit zou worden toegeschreven.

Bovendien bleef het uitgevlokte albumine gedurende twaalf uren staan, vóór de titraties werden uitgevoerd. Het eiwit had daardoor gelegenheid om verder te ontleden, eventueel ook tengevolge van bacteriële processen.

De uitkomsten, welke verkregen werden door een meer ingrijpende behandeling van het ovalbumine, bevestigden deze onderstellingen. Werd het neergeslagen eiwit uitgewassen, gedroogd in een oven bij 60° C en daarna gepoederd, dan bleek het vermogen om zuren en basen te binden door deze handelwijze opnieuw te zijn verminderd.

De resultaten hebben dus minder betrekking op de eigenlijke „denaturering”, dan wel op de ontledingsreacties, welke optraden.

Daar een opname van water bij de verwarming van een eiwit moeilijk vast te stellen was langs direkte weg, trachtten FREUND en LUSTIG (33) een indirecte bepalingmethode toe te passen. In een voor dergelijke metingen ondoelmatige luchtthermostaat werd een uit losse onderdelen samengestelde dilatometer gebracht, welke het eiwitsol bevatte.

Terwijl de temperatuur langzaam steeg, werd de uitzetting bepaald van de boven het sol aanwezige gasphase (waterdamp en

lucht), welke in de capillair door een kwikdruppel van de buitenlucht was afgesloten.

Wanneer een begin van uitvlokking in het sol optrad, werd een discontinuïteit opgemerkt in de overigens regelmatig toenemende waterdampspanning. Dit verschijnsel bestond uit een vermindering der toename van de druk bij een verhoging der temperatuur van 1° C. Hieruit leidden de auteurs af, dat water door het eiwit werd opgenomen.

Het is echter de vraag, of bij deze experimenten evenwichtstoestanden werden gemeten. Ook het evenwicht tussen het coagulum en de omringende vloeistof zal zich langzaam hebben ingesteld, daar gedurende de proeven niet geroerd werd. Juist aan het oppervlak van het sol vindt echter gemakkelijk „denaturering” plaats, zoals onder meer door RAMSDEN werd vastgesteld (86). Dit kan tengevolge hebben, dat bij de verhitting een oppervlaktevlies ontstaat, waardoor de instelling van het verdampingsevenwicht belemmerd wordt. Dat bij de coagulatie door verwarming hydratatie van het eiwit zou plaats vinden, kon door deze proefnemingen dus niet worden aangetoond.

Overigens kan tegen de gebruikte methode worden aangevoerd, dat voornamelijk de variatie van de dampdruk met de temperatuur wordt gemeten. Slechts een klein deel van de drukverandering wordt door het te bepalen effect veroorzaakt. Men zou dus de uiterste precisie moeten betrachten om op deze wijze eventuele hydratatieveranderingen vast te stellen.

Met de formoltitratie werd nagegaan, of door verwarming het aantal titreerbare groepen van albumine en serum veranderde. Deze grootte bleek kleiner te zijn voor het natieve eiwit dan voor de gecoaguleerde stof, wat op een chemiese ontleding van het laatstgenoemde produkt wees. Het wordt hierdoor begrijpelijk, dat het aan de auteurs gelukte om na de verhitting der eiwitten ontledingsprodukten aan te tonen, welke in aether oplosbaar waren.

P. S. LEWIS (67) bepaalde de coagulatiesnelheid van oxyhaemoglobine- en ovalbuminesolen bij 68° C en bij verschillende waterstofionenconcentraties.

De bedoelde snelheid werd afgeleid uit de eiwitconcentratie der filtraten van de verhitte eiwitsolen. Deze concentratie werd bepaald

door het aanwezige eiwit met ammoniumsulfaat te precipiteren, terwijl tevens gedurende 2 uren op 100°C werd verwarmd. Het verkregen neerslag werd uitgewassen, gedroogd en gewogen.

Afgezien van het feit, dat deze bepalingsmethode onnauwkeurige uitkomsten moet opleveren, kan als bezwaar worden aangevoerd, dat geen verdere correcties werden toegepast. In het sol, waarmee de bepalingen werden aangevangen, zal namelijk natief eiwit worden geadsorbeerd door het zich bij verwarming vormende coagulum.

Bovendien varieerde in de ovalbuminesolen de waarde van de pH gedurende de proef met meer dan 0,5.

SÖRENSEN stelde vast, dat de ontleding bij verwarming van eiwitten een minimum waarde vertoonde bij de isoelectrische reactie. In zure en basiese solen was de hydrolysesnelheid aanmerkelijk groter (blz. 41).

Daar dit proces het eiwit omzet in in water oplosbare verbindingen, welke met ammoniumsulfaat bij 100°C niet precipiteren, werd deze hoeveelheid ontleed eiwit door LEWIS steeds gemeten als „gedenatureerd albumine”.

Op het isoelectrische punt vertoont de coagulatiesnelheid een maximum en de hydrolysesnelheid een minimum waarde. Het is dus mogelijk, dat bij sommatie van de twee grootheden een curve verkregen wordt, welke in de buurt van de genoemde pH continu verloopt. Dit werd experimenteel ook vastgesteld. Op analoge wijze laat zich het minimum in de curve verklaren, dat bij de pH 6,8 werd gevonden. Uit dit laatste meende de onderzoeker te moeten afleiden, dat waterstof- en hydroxylionen de „denaturering” van het eiwit versnelden, zodat dit proces als een hydrolyse moest worden opgevat. Het hierbij werkzame water zou het hydratatiewater der deeltjes zijn.

Uit de gegeven bedenkingen blijkt echter, dat deze conclusie niet gesteund wordt door de experimenten.

Ook ANSON en MIRSKY (87) meenden te moeten aannemen, dat onder „denaturering” een hydratatievergroting der eiwitten moest worden verstaan. Dit maakte de bij het proces waargenomen viscositeitsverhoging begrijpelijk. Als argument hiervoor voerden zij de proeven van BURK en GREENBERG (88), HUANG en WU (89) aan.

Zij zouden door osmotiese drukmetingen aan haemoglobinesolen, welke met ureum verzadigd waren, hebben aangetoond, dat het

„gedenatureerde” eiwit hierin niet geaggregeerd aanwezig was. De relatieve viscositeit was echter aanmerkelijk vergroot, wat in dit geval uitsluitend een aanwijzing voor een verhoogde hydratatiegraad van het haemoglobine kon zijn.

Niet alleen echter leveren de bepalingen van de osmotiese druk van kolloïden zeer twijfelachtige resultaten op [KRUYT (90)], bovendien verandert het ureum de ionen- en adsorptie-evenwichten in de solen en verschuift daarbij de pH (91). OGIU en PAULI schreven dit toe aan het evenwicht: ureum $\rightleftharpoons$ ammoniumkarbonaat, dat zich in water vooral bij hogere temperaturen snel instelt (92). De stabiliteit en de viscositeit der eiwitsolen zullen daardoor beïnvloed worden. De gegeven beschouwingen zijn voor zuivere solen dus van geringe betekenis.

Neutrale zouten, welke voor of na de verwarming in kleine concentraties aan de solen werden toegevoegd, veroorzaakten eveneens een aanzienlijke stijging der viscositeit. Dit effect werd toegeschreven aan een toenemende aggregatie der deeltjes onder insluiting van water. Dat hier niet aan een vergroting der hydratatie gedacht moest worden, leidden de auteurs af uit de waarneming, dat alle invloeden, die de coagulatie van deze solen bevorderden, ook een verdere toename der relatieve viscositeit veroorzaakten.

Bovendien veranderden de stabiliteit en de viscositeit van het eiwit aanzienlijk, wanneer zuren, basen of water vóór de verwarming werden toegevoegd. Werden de solen na de verhitting met deze stoffen bedeed, dan traden slechts geringe variaties op. Wanneer de *hydratatie* inderdaad door de verwarming was veranderd, dan had men in beide gevallen een analoge invloed der toegevoegde stoffen kunnen constateren. Variaties van de hydratatiegraad stellen zich namelijk steeds reversiebel in.

Als een aanwijzing voor het optreden van een aggregatie der deeltjes kon nog beschouwd worden het feit, dat de gemeten viscositeitswaarden niet constant waren, maar met de tijd toenamen. In afwijking met het proces, in hoofdstuk III beschreven, nam de aggregatie in deze solen dus steeds groter omvang aan.

HOOFDSTUK IX

Invloed van neutrale zouten op gedehydrateerd albumine

Bij toevoeging van neutrale zouten constateerde HARDY (30,35) een volkomen analogie tussen de stabiliteitsveranderingen van verwarmde eiwitten en die van hydrophobe solen. Het tegengesteld geladen ion was het meest werkzame, terwijl de uitvlokkende werking van ionen met verschillende valentie sterk toenam met de waardigheid [SCHULZE-HARDY-regel (93)].

LOEB onderzocht de invloed van zouten met meerwaardige ionen op de coagulatie bij verwarming van isoelectries ovalbumine (94). Uitvlokking werd geconstateerd bij toevoeging van eenwaardige en tweewaardige ionen. Slechts het lanthaan- en het ferrocyanide-ion waren in staat om het gedehydrateerde albumine om te laden en zo opnieuw een stabiel sol te doen vormen. Met biezondere zorg werd ervoor gewaakt, dat de pH bij deze proeven steeds de waarde 4,8 behield.

De auteur meende, dat de resultaten onveranderd konden worden overgebracht op solen van natieve eiwitten. PAULI's experimenten toonden echter aan, dat bij de coagulatie van dergelijke systemen lyotrope invloeden niet verwaarloosd mochten worden.

MICHAELIS (95) vestigde er de aandacht op, dat ionen met gelijke valentie vaak een verschillend uitvlokkende werking uitoefenden. De coagulatie bij verhitting van aangezuurd serum werd bijvoorbeeld sterker bevorderd door de minder gehydrateerde ionen en nam daarom af in de reeks: $SCN > I > Br, Cl > NO_3 > SO_4$. Een lyotrope zoutinvloed was dus zonder twijfel aanwezig; slechts hadden de verkregen uitkomsten geen kwantitatieve betekenis, daar aan de solen tevens buffermengsels werden toegevoegd om een bepaalde waterstofionenconcentratie in te stellen.

Hierdoor ontstaan ingewikkelde ionen-evenwichten, welke een juiste interpretatie der resultaten bemoeilijken.

De onderzoekingen van PAULI en zijn medewerkers (32, 38, 96, 109) over de zoutinvloed op de uitvlokking van verwarmde eiwitten, geven feitelijk het gedrag van het *gedehydrateerde eiwit* weer.

Hun bleek namelijk, dat ook de zouten, welke een zichtbare coagulatie van de verhitte solen konden voorkomen (jodiden en rhodaniden), de dehydratatie van het eiwit niet verhinderden. Werd kippeneiwit bedeed met kaliumrhodanide en gekookt, dan scheen de stabiliteit niet te zijn veranderd. Bij verwijdering van het zout door dialyse, vlokte het sol echter totaal uit.

Voor het serumalbumine en -globuline, welke bij verwarming reversiebele veranderingen vertonen (hoofdstuk X), bestaat de mogelijkheid, dat bepaalde neutrale zouten het gedehydrateerde eiwit niet slechts opladen, maar tevens de hydratatie ervan opnieuw vergroten. Op deze wijze gelukte het PAULI en WILLHEIM om verwarmd, gecoaguleerd serumalbumine grotendeels weer in de hydrophiele toestand te brengen (zie hoofdstuk X).

Dit kan een verklaring geven voor de inwerking van zouten, welke door SPIEGEL-ADOLF bij serumalbumine werd vastgesteld (43). De meeste zouten, welke vóór de verwarming werden toegevoegd, bevorderden de precipitatie. Werden de solen eerst verhit en daarna met zout bedeed, dan trad geen nieuwe stabiliteitsverandering meer op. Het is echter mogelijk, dat na de afkoeling het albumine opnieuw gehydrateerd werd onder invloed van het aanwezige zuur of van de base. Het eiwit verkreeg hierdoor een tweede stabiliteitsfactor en vlokte niet uit, wanneer toegevoegde zouten de potentiaal der deeltjes verlaagden.

Bij het ovalbumine verloopt het denatureringsproces vrijwel totaal irreversiebel. LEPESCHKIN (97) onderzocht deze stof. Hij merkte inderdaad op, dat neutrale zouten hun invloed deden gelden onafhankelijk van de omstandigheid, of zij voor of na de verwarming aan de solen werden toegevoegd.

De inwerking der zouten op de uitvlokking bij verwarming bleek afhankelijk te zijn van de toestand, waarin het eiwit zich bevond [PAULI, HANDOVSKY (38, 98), HOFMEISTER (36) en LEPESCHKIN (73, 97)]. Men kon daarom twee gevallen onderscheiden: de zoutinvloed op solen, waarin de deeltjes een potentiaal bezaten, groter dan de kritiese waarde en de zoutwerking op isoelectris eiwit.

In de eerstgenoemde solen bezaten de deeltjes een hoge potentiaal, zodat na de verhitting geen coagulatie optrad. Neutrale zouten verminderden deze potentiaal en daarmee tevens de hydra-

tatie en de stabiliteit van het sol. De tegengesteld geladen ionen oefenden de meeste invloed uit. Door rangschikking in de volgorde der sterkst coagulerende werking werden voor zure solen de volgende reeksen verkregen: $Li > Na > K > NH_4 > Rb, Cs$ en $SCN > I > Br > NO_3 > Cl$. De volgorde der anionen was dus omgekeerd aan die, welke uit de ionenhydratatie kon worden afgeleid.

POSTERNAK (99) nam dit waar en stelde tevens vast, dat in basiese solen de normale lyotrope volgorde optrad. HÖBER (100) en SPIRO (121) toonden aan, dat deze omkering zich langzaam voltrok, wanneer de waterstofionenconcentratie van het milieu varieerde, zodat voor ongeveer neutrale solen overgangsrreeksen konden worden opgesteld. Ter verklaring van deze verschijnselen werden door KRUYT en ROBINSON (101) uitvoerige onderzoeken verricht.

In de zure solen vertoonden meerwaardige anionen een sterk uitvlokkende werking, terwijl overeenkomstige kationen zich nauwelijks onderscheidten van de univalente ionen. De besproken uitvlokkingen waren irreversibel en werden door de electrolyten in relatief kleine concentraties veroorzaakt.

Hoge electrolytconcentraties deden de eiwitten reeds bij kamertemperatuur coaguleren. De volgorde van de werkzaamheid der ionen kwam overeen met die der besproken reeksen. Hier zal men het optreden van „uitzoutingsverschijnselen” moeten aannemen. Dit betekent, dat de voor de hydratatie van het eiwit beschikbare hoeveelheid water door de zoutionen zo sterk wordt verminderd, dat de genoemde stabiliteitsfactor daalt tot beneden de kritiese waarde. De zichtbare uitvlokking zal daardoor reeds bij lage temperaturen optreden (96 en 102).

Van amphoteer kippeneiwit remden neutrale zouten de uitvlokking bij verwarming, zoals door PAULI (96) werd aangetoond. Volgens deze stabiliserende werking schikten de ionen zich in de normale lyotrope reeksen: $SO_4 < Cl < Br < I < SCN$ en $Li < Na < K < NH_4$. Verkregen de eiwitdeeltjes een positieve potentiaal door toevoeging van aardalkaliezouten, dan trad weder omkering van de volgorde op (103).

Dadelik na het ontstaan waren de gevormde precipitaten reversibel, zoals BANCROFT (104) kon aantonen. Bleven de neerslagen gedurende enige ogenblikken in contact met de toegevoegde elec-

trolyt, dan waren ze door uitwassen met water niet meer te peptiseren. PAULI had dit stadium onderzocht en hij beschouwde deze coagulatie dan ook als irreversiebel. Een uitzondering vormden de precipitaten, door alkaliezouten gevormd, welke steeds reversiebel bleven. De auteur schreef de waargenomen remming der coagulatie toe aan de biezondere bouw van het isoelectrische eiwit. Hiervoor werd een „Zwitterion“-structuur aangenomen, welke de hydratatie veroorzaakte, die het eiwit op het isoelectrische punt bezat. Neutrale zouten zouden deze structuur stabiliseren en daardoor de dehydratatie, welke na verwarming of toevoeging van alcohol optrad, tegenwerken (44, 105).

De precipitatie van gedialyseerde eiwitsolen door neutrale zouten bij kamertemperatuur heeft volgens een overeenkomstig schema plaats. Men kan dit nagaan met behulp van de volgende samenvatting van PAULI's onderzoekingen op dit gebied (96, 106):

Bij aanwezigheid van neutrale alkaliezouten.

Aard der precipitatie:	Reversiebel (peptisatie is mogelijk door verdunning of dialyse).
Verhoging der zoutconcentratie:	De precipitatie neemt toe tot een maximumwaarde en blijft verder constant.
Verhoging der eiwitconcentratie:	De grenswaarden worden lager.
Invloed der ionen:	De precipiterende werking der kationen daalt in de reeks: $Li > Na > K > NH_4$. De precipiterende werking der anionen daalt volgens: $SO_4 > \text{acetaat} > Cl > NO_3 > I > SCN$.

Bij aanwezigheid van aardalkaliezouten.

Aard der precipitatie:	Irreversiebel.
Verhoging der zout- of eiwitconcentratie:	Invloed overeenkomstig aan die, welke bij de aanwezigheid van alkaliezouten beschreven werd.

- Invloed der ionen: De precipiterende werking der anionen daalt in de reeks: $SCN > I > NO_3 > Cl > \text{acetaat} > SO_4$. Deze invloed is des te sterker, naarmate de concentraties der aardalkalieïonen hoger zijn.
- Invloed van toegevoegde neutrale alkaliezouten: Bij hoge concentraties der aardalkaliezouten versterken de alkaliezouten de uitvlokking.
- Bij lagere zoutconcentraties werken de kationen peptiserend in de reeks $Li < Na < K < NH_4$, de anionen versterken de coagulerende werking volgens: $SCN > I > NO_3 > Cl > \text{acetaat} > SO_4$.

De oudere experimenten van deze auteur geven voornamelijk de eigenschappen aan van het ovoglobuline. Als onderzoeksobject werd vaak kippeneiwit gebruikt, waarvan het globuline de minst hydrophiele component is en onder de besproken omstandigheden het eerst tot coagulatie aanleiding geeft.

De toevoeging van neutrale zouten deed de pH der solen aanmerkelijk verschuiven in de richting van het isoelectrische punt (102, 107). Hiervoor werden geen correcties ingevoerd, daar PAULI aan dit effect ten onrechte een geringe invloed op de uitkomst der metingen toeschreef (96).

HOOFDSTUK X

Reversibiliteit

Onder reversibiliteit van het bij verwarming optredende uitvlokkingsproces zal worden verstaan de mogelijkheid, om het gedehydrateerde eiwit opnieuw te doen overgaan in hydrophiele toestand. Het zo verkregen kolloïd moet daarbij overeenkomstige eigenschappen bezitten als het natieve eiwit. De laatste eis zal experimenteel slechts gedeeltelijk gecontroleerd kunnen worden, daar de structuur der eiwitten niet geheel bekend is.

Een der eerste proeven over de genoemde omzetting werd door CORIN en ANSIAUX (108) uitgevoerd. Zij verwarmden serum- en ovalbuminesolen voorzichtig tot de eerste troebeling optrad. Het afgescheiden eiwit was dan geheel te peptiseren door de vloeistof onder schudden snel af te koelen. ROBERTSON (58) meende hieruit te mogen afleiden, dat de uitvlokking door verwarming steeds een reversiebel proces was, dat echter door het verlopen van secundaire reacties een irreversiebel karakter kon aannemen. Dit was een der argumenten, waaruit hij tot een volkomen analogie tussen caseïne en verhit albumine besloot.

PAULI (109), P. S. LEWIS (67) en WU (110) herhaalden de experimenten van CORIN en ANSIAUX zorgvuldig, waarbij echter uitsluitend negatieve resultaten werden verkregen. Het vermoeden werd uitgesproken, dat de onderzoekers de solen ongelijkmatig hadden verwarmd en dat het uitgevlokte eiwit door aanwezige basiese zouten opnieuw was gepeptiseerd. Deze uitkomsten zijn begrijpelijk door waarnemingen, welke POSTERNAK (99) had verricht. Volgens de beschreven methode gelukte het hem om verwarmde, opalescente solen weer geheel doorzichtig te doen worden. Het eiwit vertoonde echter ten opzichte van magnesiumsulfaat een even geringe stabiliteit als de globulinen. De dehydratatie, door de verhitting bewerkt, was door het schudden en afkoelen niet ongedaan gemaakt. Het eiwit vormde dus een stabiel sol, maar het bleef hydrophoob.

In het algemeen werd de „denaturering” der eiwitten dan ook als een irreversiebel proces beschouwd [COHNHEIM (111) en LLOYD (112)]. Aan MICHAELIS en RONA (113) gelukte het echter, om verwarmd serumalbumine gedeeltelijk weer in een hydrophiele vorm om te zetten. Het isoelectrische eiwit werd gedurende korte tijd gekookt, waarna het gevormde neerslag met zoutzuur werd gepeptiseerd. Neutraliseerde men na enige tijd dit zure sol, zodat de isoelectrische reactie weer werd ingesteld, dan vlokte slechts een klein gedeelte van het gepeptiseerde eiwit uit. Deze werkwijze is niet bewijzend voor de vorming van een hydrophiele stof, daar door de neutralisatie ook een stabiel hydrophoob kolloïd gevormd zou kunnen worden.

Toch bleek dit niet het geval te zijn, zoals door SPIEGEL-ADOLF (43) werd aangetoond. Isoelectrische serumalbumine werd bij 100° C

gecoaguleerd. Een overmaat van het verkregen precipitaat werd met 0,002 *N* natriumhydroxyde behandeld, waardoor het vrijwel totaal gepeptiseerd werd. Door electrodialyse kon de base worden verwijderd tot het isoelectriese punt werd bereikt. Het eiwit bleef grotendeels in de soltoestand en vertoonde de eigenschappen van natief serumalbumine, voor zover dit kolloïdchemies en serologies kon worden nagegaan. De besproken omzetting was met verdund zoutzuur eveneens uitvoerbaar, mits een overmaat van het eiwit aanwezig was. Zure albuminesolen bleven daardoor bij verhitting dikwijls voor meer dan 70 procent uit natief eiwit bestaan. Voegde men zuren of basen in grotere concentraties toe, dan behield het albumine na de verwarming steeds een hydrophoob karakter.

De reversibiliteit der door aethylalkohol gedehydrateerde solen bleek geheel overeen te komen met die der verwarmde eiwitten(114). De inwerking van verdunde zuren en basen was dus in staat om beide „denatureringsprocessen” gedeeltelijk in omgekeerde richting te doen verlopen. SPIEGEL-ADOLF meende daarom de „denaturering” als een condensatie onder uittreding van water te moeten beschouwen en niet als een hydrolyse. De laatstgenoemde reactie werd door zuren en basen sterk versneld, zodat het niet begrijpelijk was, hoe in hun tegenwoordigheid het omgekeerde proces zou kunnen verlopen.

Er werd tevens op gewezen, dat bij het ovalbumine de besproken eigenschappen niet voorkwamen. Het gecoaguleerde eiwit was op geen enkele wijze om te zetten in een hydrophiel produkt. Dit werd toegeschreven aan een secundaire omzetting van het eiwit, welke naast de dehydratatie optrad (zie blz. 39).

De genoemde peptisatiemethoden golden uitsluitend voor electrolytvrij gedialyseerde solen. Bij aanwezigheid van neutrale zouten verliep de coagulatie van het serumalbumine steeds irreversiebel. Ogenblikkelijk na de dehydratatie trad dan blijkbaar een zodanige inwerking van het zout op, dat de mogelijkheid voor de vorming van nieuwe hydrophiele plekken op de eiwitdeeltjes werd uitgesloten.

Aan DENAYER (115) gelukte het, om gecoaguleerd albumine in een hydrophiele vorm om te zetten, door het met water onder druk te verhitten. In hoeverre het verkregen produkt tevens gehydrolyseerd was, werd niet nagegaan. Wel zouden de eigenschappen ervan overeengekomen zijn met die van het natieve eiwit.

Een andere methode om gedehydrateerd serumalbumine in hydrophiele toestand te brengen, werd door WILLHEIM (116) beschreven. Hij maakte gebruik van geconcentreerde oplossingen (1 tot 2 N) van natriumsalicylaat, natriumbenzoeaat, kaliumrhodanide en kaliumphthalaat. De metingen met het natriumbenzoeaat hebben geringe betekenis, daar werd vastgesteld, dat het zout in de solen merkbaar hydrolyties gesplitst werd en een basiese reactie veroorzaakte. Het kaliumrhodanide gaf een gedeeltelijke, het natriumsalicylaat een vrij volledige omzetting van het uitgevlokte eiwit in een hydrophiele vorm. De ouderdom en de voorbehandeling van het coagulum speelden hierbij een belangrijke rol.

Neutrale zouten belemmerden het peptisatieproces, waarbij de anionen, afhankelijk van de grootte der tegenwerking, gerangschikt konden worden in de volgende reeks: $SO_4 > Cl > Br > NO_3 > I$. Hier treedt de lyotrope volgorde op, zodat aangenomen mag worden, dat bij het besproken proces de hydratatieveranderingen van het eiwit een belangrijke rol vervullen. De kationen oefenden slechts een geringe werking uit. In zure solen werd een omkering van de invloed der ionen opgemerkt. Kaliumrhodanide werkte dan sterk uitvlokkend, in plaats van peptiserend.

Uit viscositeitsbepalingen leidde WILLHEIM af, dat bij verwarming de aggregatie der eiwitdeeltjes sterker werd. Dit vergemakkelijkte de uitvlokkings van het sol. Slechts zeer geconcentreerde oplossingen van kaliumrhodanide waren in staat, om deze dispersiteitsvermindering tegen te gaan. Kaliumrhodanide-oplossingen met een concentratie kleiner dan 0,1 N, deden de relatieve viscositeit van albuminesolen stijgen, wanneer de laatste na de toevoeging van het zout werden verhit. Daarbij verminderde de stabiliteit, zodat een aggregatie der deeltjes was opgetreden. Werden geconcentreerde rhodanideoplossingen toegevoegd, dan daalde de relatieve viscositeit door de verwarming, terwijl het albumine hydrophiel bleef. Er was dus geen dehydratatie opgetreden, maar een verhoging van de dispersiteitsgraad van het eiwit.

Ook van serumalbumine, dat door aethylalkohol was uitgevlokt, kon de hydratatie zodanig worden vergroot, dat solen ontstonden, welke analoog waren aan die van het natieve eiwit.

ANSON en MIRSKY (117) bestudeerden de reversibiliteit aan hae-

moglobinesolen. Bij 100° C werd de stof gedehydrateerd en dan opnieuw in een hydrophiele vorm gebracht door de zure solen voorzichtig te neutraliseren. Bracht men het eiwit dadelik op het isoelectrische punt, dan precipiteerde het totaal. Werde echter zoveel base toegevoegd, dat nog juist geen neerslag ontstond en na enige tijd de rest van de hoeveelheid loog, nodig om het isoelectrische punt te bereiken, dan bleef ongeveer de helft van het haemoglobine gepeptiseerd. Men verkreeg hetzelfde resultaat door het verhitte sol gedurende enige tijd te bewaren, nadat het met een overmaat base was bedeed.

Uit het spectrum en de zuurstofbinding van het eiwit kon zeer nauwkeurig worden bepaald, of het in natieve of in „gedenatureerde” toestand verkeerde. Het gedeelte van het haemoglobine, dat opnieuw gepeptiseerd was, bleek in de genoemde eigenschappen met de natieve stof overeen te komen.

Proeven, met serumalbumine genomen, leverden analoge resultaten op. De reversibiliteit was echter groter dan bij het haemoglobine, zodat bij behandeling van verhit serumalbumine met een zuur of base bijna steeds een belangrijk gedeelte in hydrofiel eiwit werd omgezet.

Bij het ovalbumine kon een omkering van de „denaturering” niet worden vastgesteld. Eerst onlangs gelukte het aan de onderzoekers om, onder gunstige omstandigheden, een zeer klein gedeelte van het verwarmde ovalbumine om te zetten in de hydrophiele toestand. De irreversibiliteit der dehydratatie werd toegeschreven aan de sterke neiging van ovalbuminedeeltjes om aggregaten te vormen (zie blz. 65). Ook ver buiten het gebied, waar zichtbare precipitatie optrad (bij ongeveer isoelectrische reactie), kon dit door viscositeitsmetingen worden vastgesteld.

Dergelijke verschillen tussen ovalbumine en serumalbumine werden ook door PAULI en WEISS (119) opgemerkt. Het verhitte ovalbumine kon alleen met grote moeite opnieuw worden gehydrateerd. Slechts een halfverzadigde oplossing van ureum vormde uit het eiwit een sol, dat na dialyse stabiel bleef en de voornaamste eigenschappen van de natieve stof vertoonde.

Het gedehydrateerde serumalbumine was echter gemakkelijk in een hydrophiele vorm om te zetten door behandeling met natrium-

hydroxyde, natriumsalicylaat, kaliumrhodanide of formamide. De mogelijkheid bestaat, dat het eiwit met ureum chemies reageerde. De optiese draaiing van solen, welke aanmerkelijke hoeveelheden ureum bevatten, was namelijk abnormaal groot. Bovendien vertoonden dergelijke solen een kleurreactie met nitroprussidenatrium, wat een aanwijzing was, dat een chemiese omzetting had plaats gehad (zie blz. 40).

De verschillen in de reversibiliteit lopen bij de eiwitten parallel met de verschillen in de relatieve viscositeit, welke de isoelectriese solen vertonen. Uit metingen van CHICK en LUBRZYNSKA (78) blijkt, dat bij gelijke temperatuur en eiwitconcentratie serumalbuminesolen een grotere viscositeit bezitten, dus sterker gehydrateerd zijn, dan solen van ovalbumine. Bij de eerstgenoemde stof is de mogelijkheid, om het verhitte eiwit in de hydrophiele vorm om te zetten, dan ook veel groter. Tevens zal de reversibiliteit afhankelijk zijn van eventuele secundaire omzettingen der geaggregeerde eiwitdeeltjes.

HOOFDSTUK XI

Door alcohol gedehydrateerde eiwitten

De stabiliteitsverhoudingen van eiwitsolen, aan welke aethylalcohol is toegevoegd, naderen sterk die van verwarmde solen. De resultaten, door PAULI en BRÜLL (118) verkregen, bewezen de dehydraterende werking van de alcohol. Zij merkten op, dat het eiwit daarbij een stabiliteitsfactor armer werd en zich als een hydrophoob kolloïd gedroeg. De invloed der neutrale zouten kwam overeen met die op de coagulatie door verwarming.

SCHORR (120) toonde met coagulatieproeven aan, dat de precipitatie door alcohol een minimum waarde vertoonde bij die waterstofionenconcentraties, waarbij de hydratatie der eiwitten het grootst was. Een sterke uitvlokking trad op, wanneer de *pH* gebracht werd op de isoelectriese waarde of wanneer de solen met een overmaat zuur werden bedeed.

In dit geval verminderden de anionen de potentiaal en tevens de hydratatie der eiwitdeeltjes. Dat hier sprake was van een werking der tegengesteld geladen ionen, bleek uit de invloed van zwavelzuur en trichloorazijnzuur. Werde een overmaat aethylalcohol 96 % aan

de solen toegevoegd, dan kon bij de aanwezigheid van zoutzuur het besproken coagulatieminimum scherp worden bepaald. Werden de solen echter bedeed met variërende hoeveelheden zwavelzuur of trichloorazijnzuur, dan was het minimum nauweliks waarneembaar. Het trad slechts op, wanneer de proeven werden uitgevoerd met 45 % aethylalkohol. In het laatste geval verminderden de zuuranionen de hydratatie van het eiwit reeds aanzienlik, wanneer zij in kleine concentraties aanwezig waren. Zij versterkten daardoor de precipiterende werking van de alkohol.

SPIRO (121) vergeleek de invloed van aethylalkohol op eiwitten met die van neutrale zouten in hoge concentraties; hij meende in beide gevallen met een soort uitzoutingsproces te doen te hebben. Een punt van overeenkomst was, dat de gevormde neerslagen, kort na hun ontstaan, reversiebel waren. Oudere precipitaten waren daarentegen veel moeiliker peptiseerbaar. Tevens werd aangenomen [ook door LEPESCHKIN (74, 122)], dat verwarming der solen of een toevoeging van alkohol een dehydratatie van het eiwit veroorzaakte. De beide manipulaties versterkten dan ook wederkerig elkaars invloed.

De auteur vestigde er echter de aandacht op, dat onder biezondere omstandigheden solen een *verhoogde* stabiliteit konden verkrijgen door de toevoeging van aethylalkohol. Aangezuurd kippen-eiwit, dat ook neutrale zouten bevatte, vlokke geheel uit, wanneer het met twee volumina water werd verdund en daarna verhit. Werd in plaats van water aethylalkohol toegevoegd, dan trad bij verwarming de coagulatie niet op. Bij meerwaardige alkoholen was deze stabiliserende werking nog sterker (121, 123). Eventuele veranderingen der waterstofionenconcentratie in de solen werden echter niet nagegaan.

Aan zure caseïnesolen werd door KRUYT en LIER (124) waargenomen, dat aethylalkohol of aceton, toegevoegd in hoeveelheden van 40 tot 50 gewichtsprocenten, de relatieve viscositeit der solen aanmerkelijk vergrootten. Dat hierbij niet aan een aggregatie der deeltjes moest worden gedacht, kon worden afgeleid uit bepalingen van de grenswaarden der solen. Tegelijk met de vergrote viscositeit werd namelijk vastgesteld, dat ook de stabiliteit was toegenomen. Een analoog gedrag vertoonden zure gliadinesolen, welke aceton

bevatten en welke met verschillende hoeveelheden electrolyt werden bedeed [H. L. BUNGENBERG DE JONG en KLAAR (125)]. JIRGENSONS (126) bevestigde deze resultaten met zijn experimenten. Zowel electrolytvrije eiwitten als solen, welke neutrale zouten bevatten, vertoonden een maximum van uitvlokking, wanneer variërende hoeveelheden alkohol werden toegevoegd. Passeerde men dit maximum, dan trad een solvaterende werking van de alkohol op de voorgrond.

Bij gedialyseerde serum- en ovalbuminesolen werd met methyl- en aethylalkohol een minimum van stabiliteit waargenomen bij 10, resp. 5 grammolen alkohol per liter. Verhoogde men de concentratie van de aethylalkohol tot ongeveer 9 grammolen, dan veroorzaakte dit een duidelijk waarneembare vergroting der stabiliteit. Bij toevoeging van 5 grammolen propylalkohol per liter was dit effect zo sterk, dat geen opalescentie meer optrad.

Ook van andere organiese verbindingen werd de werking nagegaan, waarbij de onderzoeker een verband vaststelde tussen het stabiliserend vermogen en de diëlectriciteitsconstante der toegevoegde stoffen. Het minimum van stabiliteit der solen trad bij een lagere alkoholconcentratie op, naarmate de diëlectriciteitsconstante van de alkohol kleiner was (122, 126, 127).

Bij aanwezigheid van neutrale zouten veroorzaakte de toevoeging van kleine hoeveelheden der hogere alcoholen in het algemeen een vermindering van de stabiliteit. Slechts wanneer het zout en de organiese verbinding beiden in hoge concentratie aanwezig waren, kon een vergrote stabiliteit der eiwitten worden waargenomen. Onder deze omstandigheden werkten methylalkohol, aethylalkohol en aceton echter niet of zeer zwak stabiliserend.

Als verklaring voor deze verschijnselen werd een verlaging van de diëlectriciteitsconstante van het milieu aangenomen, welke door de alkoholtoevoeging was veroorzaakt. Het dissociatie-evenwicht der electrolyten zou daardoor worden verschoven, wat een variatie van hun precipiterende en peptiserende werking mogelijk maakte.

Voor de gevallen, waarin de solen door de toegevoegde stof opnieuw werden gestabiliseerd, meende JIRGENSONS behalve de besproken diëlectriese verandering, een vergrote solvatatie der deeltjes te moeten aannemen. De vergroting van de relatieve viscositeit der solen maakte dit waarschijnlijk.

OVERZICHT

Onderzoekingen aan agarsolen verricht door KRUYT en BUNGENBERG DE JONG, wezen uit, dat bij verwarming de hydratatiegraad der deeltjes regelmatig verminderde. De kolloïdchemiese eigenschappen van verhitte albuminesolen maakten het waarschijnlijk, dat het oorspronkelijk hydrophiele eiwit door de verwarming hydrophoob was geworden.

Uit relatieve viscositeitsmetingen, bij verschillende temperaturen verricht, werd de conclusie getrokken, dat bij de verhitting van het eiwit zich meerdere processen voltrokken. Aangetoond kon worden, dat bij hogere temperaturen een dehydratatie van het albumine optrad, welke door een aggregatie der deeltjes werd gevolgd. Het laatstgenoemde proces manifesteerde zich door een verhoging van de relatieve viscositeit der solen bij temperaturen tussen 50° en 90° C. De dehydratatie ging gepaard met een daling van de viscositeit, welke tussen 0° en 40° C meetbaar was. De laatste verandering moet beschouwd worden als de oorzaak van het ontstaan der hydrophobe albuminen. De hydratatie van deze produkten is niet geheel vernietigd, zoals uit proefnemingen van SÖRENSEN, WEBER en VERSMOLD kan worden afgeleid. De hydratatiegraad is slechts kleiner geworden dan de kritiese waarde, zodat de stabiliteit der verwarmde eiwitten uitsluitend van andere factoren afhankelijk is. Of de eiwitten na verhitting zullen coaguleren of een stabiel sol zullen vormen, hangt af van de grootte der potentiaal, welke de albuminedeeltjes bezitten.

De viscositeitsbepalingen konden uitsluitend worden verricht aan solen, welke behoorlik waren gestabiliseerd door de toevoeging van een zuur of een base. De potentiaal der deeltjes werd zo hoog boven de kritiese waarde opgevoerd, dat slechts een begin van aggregatie, onder insluiting van water, kon optreden. Deze albuminesolen volgden ook de wet van POISEUILLE.

De besproken opvatting wordt bovendien gesteund door het feit, dat stoffen als aethylalkohol, welke in hogere concentraties dehydraterend werken, uit albuminen eveneens hydrophobe solen doen ontstaan. Aangetoond kon worden, dat verwarming van het eiwit of toevoeging van grotere hoeveelheden aethylalkohol analoge veranderingen van de relatieve viscositeit der solen veroorzaakte.

Naast deze kolloïdchemiese variaties trad een chemiese ontleding van het albumine door warm water op. Door deze hydrolyse ontstonden ontledingsprodukten, waarvan de samenstelling eenvoudiger was dan die van het natieve eiwit. De stoffen waren tevens meer hydrophiel dan het albumine, waaruit zij gevormd werden. De hydrolyse kan daarom niet als het karakteristieke „denatureringsproces” worden beschouwd.

De meeste onderzoeken over het mechanisme der „denaturering” van verhitte eiwitten bevinden zich in goede overeenstemming met de hier gegeven beschouwingen. Sommige auteurs herkennen echter het hydrolytische proces niet als een secundaire reactie en meenden er de „denaturering” aan te moeten toeschrijven. Andere afwijkende hypothesen werden in hoofdstuk VIII besproken. Tenslotte werden publicaties nagegaan, welke zich bezig hielden met de mogelijkheid om de dehydratatie, welke bij verwarming der albuminen optrad, in omgekeerde zin te doen verlopen. Deze „reversibiliteit” kon gemakkelijk worden vastgesteld bij serumalbumine-solen. Onder overeenkomstige omstandigheden bezitten deze een grotere hydratatie dan het ovalbumine en zijn dus meer hydrophiel. Men constateerde dan ook, dat de omzetting van verwarmd *ovalbumine* in een hydrophiele vorm met grote moeilijkheden gepaard ging.

LITERATUUROVERZICHT.

1. KRUYT en BUNGENBERG DE JONG. Z. Physik. Chem. **100**, 250 (1921).
Kolloidchem. Beihefte **28**, 1, 34 (1928).
2. BUNGENBERG DE JONG. Rec. trav. chim. **47**, 797 (1928).
Kolloidchem. Beihefte **29**, 454 (1929).
3. PAULI. Biochem. Z. **152**, 355 (1924).
4. ETTISCH en EWIG. Biochem. Z. **195**, 175 (1928).
ETTISCH, BRADFIELD en EWIG. Kolloid Z. **45**, 141 (1928).
ETTISCH en EWIG. Biochem. Z. **216**, 401, 430 (1929).
5. SÖRENSEN en HÖYRUP. Compt. rend. trav. lab. Carlsberg **12**, 12 (1916).
6. ZSIGMONDY en HEYER. Z. anorg. allgem. Chem. **68**, 169 (1910).
7. BECHHOLD. Z. angew. Chem. **37**, 494 (1924).
8. EINSTEIN. Ann. Physik **19**, 289 (1906); **34**, 591 (1911).
VON SMOLUCHOWSKI. Kolloid Z. **18**, 190 (1916).
9. BUNGENBERG DE JONG. Rec. trav. chim. **42**, 1 (1923).
10. SÖRENSEN en JÜRGENSEN. Biochem. Z. **31**, 397 (1911).
KRUYT en BUNGENBERG DE JONG. Kolloidchem. Beihefte **28**, 8 (1928).
TENDELOO. Rec. trav. chim. **48**, 23 (1929).
11. PAULI. Kolloid Z. **12**, 222 (1913).
12. KOLTHOFF. Säure-Basen-Indicatoren, 240, 278. Berlin 1932.
KOLTHOFF. The Colorimetric and Potentiometric Determination of *pH*,
35. New York 1931.
13. KOLTHOFF. The Colorimetric and Potentiometric Determination of *pH*,
96. New York 1931.
VONK. Instrumentarium voor de electrometrische bepaling der water-
stofionenconcentratie, 8. Utrecht 1931.
14. TENDELOO. Lading en Hydratatie, 14. Dissertatie. Utrecht 1926.
Zie ook: KRUYT en ROBINSON. Proc. Acad. Sci. Amsterdam **27**, 886
(1924).
15. PAULI. Kolloidchemie der Eiweiskörper **I**, 9. Dresden, Leipzig 1920.
16. SPIEGEL-ADOLF. Colloid Chemistry (ALEXANDER) **II**, 325. New York
1928.
17. ALEXANDER. Colloid Chemistry **II**, 325. New York 1928.
18. SHEPPARD en HUDSON. J. Am. Chem. Soc. **53**, 760 (1931).
SHEPPARD, HUDSON en HOUCK. Kolloid Z. **58**, 348 (1932).
19. BUNGENBERG DE JONG. Biochem. Z. **212**, 318 (1929); **221**, 182, 392,
403 (1930); **232**, 338 (1931); **234**, 367 (1931); **235**, 185 (1931); **248**, 115,

- 131, 309, 335 (1932); **254**, 15, 35 (1932); **257**, 62 (1933); **259**, 436, 442 (1933); **260**, 161 (1933).
 Protoplasma **15**, 110 (1932).
 Zie ook: CHICK en MARTIN. Biochem. J. **7**, 380 (1913).
20. FRÉDÉRIQUE. Z. Physiol. **3**, 601 (1890).
21. HEWLETT. J. Physiol. **13**, 493 (1892).
22. LIEBERKÜHN. Arch. anat. Physiol. Med. 285 (1848).
23. BRÜCKE en NEUMEISTER. Z. Biol. **24**, 272 (1888).
 LIMBOURG. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **13**, 450 (1889).
24. ARONSTEIN. Pflüger's Arch. ges. Physiol. **8**, 75 (1874).
25. SCHMIDT. Pflüger's Arch. ges. Physiol. **11**, 1 (1875).
26. HEYNSIUS. Pflüger's Arch. ges. Physiol. **9**, 514 (1874); **12**, 549 (1876).
27. KIESERITZKY. Dissertatie Dorpat 1882.
28. ROSENBERG. Dissertatie Dorpat 1883.
29. LEPESCHKIN. Kolloid Z. **32**, 168 (1923).
 Biochem. J. **16**, 678 (1922).
30. HARDY. J. Physiol. **24**, 158 (1899).
 Z. physik. Chem. **33**, 326, 385 (1900).
 Proc. Roy. Soc. London **66**, 95, 110 (1900).
 J. Phys. Chem. **4**, 235 (1900).
 J. Physiol. **33**, 251 (1905).
 WOOD en HARDY. Proc. Roy. Soc. London **81**, 38 (1909).
31. MICHAELIS en MOSTYNSKI. Biochem. Z. **25**, 401 (1910).
 MICHAELIS. The effect of ions in colloidal systems. Baltimore 1925.
32. PAULI. Pflüger's Arch. ges. Physiol. **78**, 315 (1899).
 Hofmeister's Beitr. Chem. Physiol. Path. **7**, 531 (1906).
 PAULI en WAGNER. Biochem. Z. **27**, 296 (1910).
33. FREUND en LUSTIG. Biochem. Z. **167**, 355 (1926).
34. PAULI. Biochem. Z. **152**, 355 (1924); **187**, 403 (1927).
 PAULI en ADOLF. Biochem. Z. **152**, 360 (1924).
35. HARDY en WHETHAM. J. Physiol. **24**, 288 (1899).
36. HOFMEISTER. Arch. exptl. Path. Pharmacol. **24**, 247 (1888); **25**, 1 (1889); **27**, 395 (1890); **28**, 210 (1891).
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **14**, 165 (1890).
 Zie ook: LEWITH. Arch. exptl. Path. Pharmacol. **24**, 1 (1888).
37. PAULI. Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. Path. **7**, 531 (1906).
 PAULI en HANDOVSKY. Biochem. Z. **18**, 340 (1909).
 PAULI. Eiweiskörper und Kolloide, 7. Wien 1926.
 Kolloid Z. **40**, 185 (1926).
 Biochem. Z. **202**, 337 (1928).
 Zie ook: MAYER. Compt. rend. Soc. biol. **62**, 317, 521 (1907); **63**, 184 (1907).
- WEBER, RONA en NACHMANN SOHN. Biochem. Z. **204**, 215 (1929).
38. HANDOVSKY. Kolloid Z. **7**, 183, 267 (1910).
 Biochem. Z. **25**, 510 (1910).

39. PAULI en SAFRIN. *Biochem. Z.* **233**, 86 (1931).
Zie ook: PAULI en HIRSCHFELD. *Biochem. Z.* **62**, 245 (1914).
40. LOEB. J. *Gen. Physiol.* **1**, 39 (1918); **3**, 85 (1920).
LOEB. *Die Eiweiskörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen*, 47. Berlin 1924.
41. PAULI en WAGNER. *Sitz. Akad. Wiss. Wien. Math. nat. Klasse.* 17 März 1910.
WAGNER. *Biochem. Z.* **104**, 190 (1920).
42. PAULI en HANDOVSKY. *Biochem. Z.* **18**, 340 (1909).
PAULI. *Kolloidchemie der Eiweiskörper I*, 14, 15. Dresden, Leipzig 1920.
PAULI en STENZINGER. *Biochem. Z.* **205**, 71 (1929).
PAULI. *Kolloid Z.* **31**, 252 (1922); **51**, 27 (1930).
43. SPIEGEL-ADOLF. *Kolloid Z.* **38**, 127 (1926).
Biochem. Z. **170**, 126 (1926); **252**, 37 (1927).
Colloid Chemistry (ALEXANDER) II, 303. New York 1928.
Zie ook: HANDOVSKY. *Leitfaden der Kolloidchemie*, 100. Dresden, Leipzig 1922.
44. PAULI. *Kolloid Z.* **53**, 51 (1930).
WEBER. *Biochem. Z.* **218**, 1 (1930).
PAULI. *Trans. Faraday Soc.* **26**, 723 (1930).
PAULI en WEISS. *Biochem. Z.* **233**, 381 (1931).
PAULI. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **9**, 23 (1932).
OGIU en PAULI. *Biochem. Z.* **250**, 535 (1932).
45. KRUYT. *Colloids*, 207. New York, London 1930.
46. PAULI en LAMBRECHTS. *Trans. Faraday Soc.* **26**, 728 (1930).
47. HARRIS. *Proc. Roy. Soc. London B* **94**, 426, 441 (1923).
Zie ook: YOUNG. *Proc. Roy. Soc. London B* **93**, 235 (1922).
48. MASTIN en SCHRIJVER. *Biochem. J.* **20**, 1177 (1926).
49. ARNOLD. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **70**, 300 (1911).
50. SCHORR. *Biochem. Z.* **13**, 173 (1908); **37**, 424 (1911).
ETTISCH, SACHSSE en LANGE. *Biochem. Z.* **230**, 93 (1931).
ETTISCH en SACHSSE. *Biochem. Z.* **230**, 115 (1931).
SCHULZ en ETTISCH. *Z. physik. Chem. A* **164**, 97 (1933).
51. SÖRENSEN en JÜRGENSEN. *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg* **10**, 1 (1911).
SÖRENSEN. *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg* **15**, nr. 9 (1923—1925).
SÖRENSEN. *Proteins*. New York 1925.
52. Zie ook: QUAGLIARIELLO. *Biochem. Z.* **44**, 157 (1912).
53. MICHAELIS en RONA. *Biochem. Z.* **18**, 336 (1909).
54. NEWTON en GORTNER. *Botan. Gaz.* **74**, 442 (1922).
GORTNER. *Colloid Symp. Mon.* **1**, 392 (1923).
ROBINSON. *J. Econ. Entomol.* **20**, 80 (1927).
55. WEBER en VERSMOLD. *Biochem. Z.* **234**, 62 (1931).
56. ROBERTSON. *The physical Chemistry of the Proteins*, 121—129. New York 1918.

57. HENDERSON en RYDER. *Proc. Am. Soc. biol. Chem.* **1**, 26 (1907).
J. Biol. Chem. **3**, XVII (1907).
58. ROBERTSON. *The physical Chemistry of the Proteins*, 304—309. New York 1918.
59. ALEXANDER. *Colloid Chemistry II*, 312, 319, 320, 326. New York 1928.
60. HOPKINS. *Nature* **126**, 328, 383 (1930).
61. LOEB. *J. Gen. Physiol.* **4**, 759 (1922); **5**, 479 (1922).
Arch. néerland. physiol. **7**, 510 (1922).
LOEB. *Die Eiweiskörper und Kolloide*, 264, 269, 273. Berlin 1924.
62. LOEB. *J. Gen. Physiol.* **3**, 827 (1921).
63. BANCROFT en RUTZLER. *Colloid Symp. Mon.* **8**, 144 (1931).
64. PAULI en MODERN. *Biochem. Z.* **156**, 482 (1925).
FRISCH, PAULI en VALKÓ. *Biochem. Z.* **164**, 401 (1925).
65. LEPESCHKIN. *Kolloid Z.* **32**, 100 (1923).
66. OSTWALD. *Kolloid Z.* **12**, 213 (1913).
67. P. S. LEWIS. *Biochem. J.* **20**, 965, 978, 984 (1926).
68. W. C. Mc C. LEWIS. *Z. physik. Chem.* **130**, 345 (1927).
Chem. Reviews **8**, 81 (1931).
69. MICHAELIS en MOSTYNSKI. *Biochem. Z.* **24**, 79 (1910).
MICHAELIS. *Physikalische Chemie der Kolloide*. (RICHTER-KARANYI) **II**, 391.
Zie ook: BECHHOLD. *Die Kolloide in Biologie und Medizin*, 161—164. Dresden, Leipzig 1929.
70. BOOTH. *Biochem. J.* **24**, 158 (1930).
Zie ook: CHICK en MARTIN. *Kolloidchem. Beihefte* **5**, 49 (1913).
HARRIS. *Proc. Roy. Soc. London B* **94**, 426 (1923).
71. HIRSCH-POGANY. *Biochem. Z.* **128**, 396 (1922).
72. LEWIS. *Biochem. J.* **21**, 46 (1927).
CUBIN. *Biochem. J.* **23**, 25 (1929).
73. LEPESCHKIN. *Kolloid Z.* **31**, 342 (1922); **32**, 42, 44, 100, 166, 168 (1923).
74. LEPESCHKIN. *Kolloid Z.* **39**, 41 (1926).
75. FREUNDLICH. *Kapillarchemie II*, 439. Leipzig 1932.
76. CHICK en MARTIN. *J. Physiol.* **40**, 404 (1910); **43**, 1 (1911); **45**, 61, 261 (1913).
Kolloidchem. Beihefte **5**, 49 (1913).
77. WICHMANN. *Z. Physiol.* **27**, 575 (1899).
Zie ook: BRETLAND FARMER. *Chem. News* **81**, 207 (1900).
78. CHICK en LUBRZYNSKA. *Biochem. J.* **8**, 59, 261 (1914).
79. CLARK. *Am. J. Physiol.* **61**, 72 (1922); **72**, 230 (1925); **73**, 649 (1925).
Zie ook: LECOMTE DU NOUY. *Ann. inst. Pasteur* **42**, 742 (1928); **43**, 749 (1929); **44**, 109 (1930).
Kolloid Z. **61**, 375 (1932).
80. Zie: HARDY. *J. Physiol.* **24**, 158 (1899).
81. SCHOORL. *Rec. trav. chim.* **43**, 203 (1924).
Zie ook: ZOJA. *Kolloid Z.* **3**, 249 (1908).

- MORUZZI. *Biochem. Z.* **22**, 232 (1909).
82. WU en YEN WU. *J. Biochem. (Japan)* **4**, 345 (1924).
 WU, TENBROECK en LI. *Chinese J. Physiol.* **1**, 277, 407 (1927).
 WU. *Chinese J. Physiol.* **3**, 1 (1929); **5**, 321 (1931).
 WU en CHEN. *Chinese J. Physiol.* **3**, 7, 75 (1929).
83. WU. *J. Biol. Chem.* **51**, 33 (1922).
84. MASTIN en REES. *Biochem J.* **20**, 759 (1926).
85. HENDRIX en WILSON. *J. Biol. Chem.* **79**, 389 (1928).
86. RAMSDEN en DUBOIS. *Arch. Anat. Physiol. Physiol. Abt.* 517 (1894).
 RAMSDEN. *Z. physik. Chem.* **47**, 336 (1904).
 PROC. Roy. Soc. London **72**, 156 (1904).
 WU en LING. *Chinese J. Physiol.* **1**, 407 (1927).
 Zie ook: WIECHOWSKY. *Biochem. Z.* **81**, 278 (1917).
87. ANSON en MIRSKY. *J. Gen. Physiol.* **15**, 341 (1932).
88. BURK en GREENBERG. *J. Biol. Chem.* **87**, 197 (1930).
89. HUANG en WU. *Chinese J. Physiol.* **4**, 221 (1930).
90. KRUYT. *Colloids*, 219. New York, London 1930.
91. SPIRO. *Z. physik. Chem.* **30**, 182 (1900).
 KRUYT en LIER. *Kolloidchem. Beihefte* **28**, 440 (1929).
 PAULI en WEISS. *Biochem. Z.* **233**, 381 (1931).
 WU en YANG. *Chinese J. Physiol.* **5**, 301 (1931).
 WU en LIU. *Chinese J. Physiol.* **5**, 309 (1931).
92. OGIU en PAULI. *Biochem. Z.* **250**, 535 (1932).
 Zie ook: G. N. LEWIS en BURROWS. *J. Am. Chem. Soc.* **34**, 1515 (1912).
93. KRUYT. *Colloids*, 169. New York, London 1930.
94. LOEB. *J. Gen. Physiol.* **1**, 39 (1918); **4**, 759 (1922); **5**, 395, 479 (1923);
6, 307 (1924).
95. MICHAELIS en RONA. *Biochem. Z.* **27**, 38 (1910); **94**, 225 (1919).
96. PAULI. *Hofmeister's Beitr. Chem. Physiol. Path.* **3**, 225 (1903); **5**, 27
 (1904); **6**, 233 (1905); **11**, 415 (1908).
Kolloid Z. **3**, 2 (1908).
 Zie ook: OSTWALD. *Kolloid Z.* **2**, 108, 138 (1907).
 FODOR. *Kolloid Z.* **30**, 313 (1922).
97. LEPESCHKIN. *Biochem. J.* **16**, 678 (1922).
98. PAULI. *Kolloid Z.* **12**, 222 (1913).
 Zie verder: PAULI en HANDOVSKY. *Biochem. Z.* **24**, 239 (1910).
 PAULI en FALEK. *Biochem. Z.* **47**, 269 (1912).
 ORYNG en PAULI. *Biochem. Z.* **70**, 368 (1915).
 PAULI en MATULA. *Biochem. Z.* **80**, 187 (1917).
 PAULI. *Kolloid Z.* **31**, 252 (1922).
 PAULI en SCHÖN. *Biochem. Z.* **153**, 253 (1924).
 PAULI. *Biochem. Z.* **202**, 337 (1928).
 PAULI en WEISS. *Biochem. Z.* **203**, 103 (1928).
 TAKEO ITO en PAULI. *Biochem. Z.* **213**, 95 (1929).
 TAKEO ITO. *Biochem. Z.* **233**, 444 (1931).

- PAULI. *Naturwissenschaften* **20**, 28 (1932).
99. POSTERNAK. *Ann. inst. Pasteur*. **15**, 85, 169, 451, 570 (1901).
100. HÖBER. *Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. Path.* **11**, 35 (1908).
101. KRUYT en ROBINSON. *Verslag Akad. Wetenschappen Amsterdam* **35**, 812 (1926).
Proc. Acad. Sci. Amsterdam **29**, 1244 (1926).
 ROBINSON. *The lyotropic series. Dissertatie, Utrecht* 1929.
102. MATSUMURA en MATULA. *Kolloid Z.* **32**, 37 (1922).
103. PAULI. *Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. Path.* **5**, 27 (1904).
 KAHO. *Biochem. Z.* **117**, 87 (1921); **151**, 102 (1924).
 Zie ook: SZENT GYÖRGYI. *Biochem. Z.* **110**, 119 (1920).
104. BANCROFT. *J. Phys. Chem.* **19**, 349 (1915).
105. PAULI. *Kolloid Z.* **40**, 185 (1926); **51**, 27 (1930).
 PAULI en STENZINGER. *Biochem. Z.* **205**, 71 (1929).
 PAULI en VALKÓ. *Elektrochemie der Kolloide*, 391, 454, 464. Wien 1929.
106. CSAPÓ en VON KLOBUSITZKY. *Biochem. Z.* **151**, 90 (1924).
 VON KLOBUSITZKY. *Biochem. Z.* **209**, 304 (1929); **233**, 120 (1930).
 Zie ook: MELLANBY. *J. Physiol.* **33**, 338 (1905); **36**, 288 (1907).
 HOWE. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **20**, 91 (1922).
J. Biol. Chem. **57**, 241 (1923).
107. PAULI en HANDOVSKY. *Biochem. Z.* **18**, 340 (1909).
 MANABE en MATULA. *Biochem. Z.* **52**, 398 (1913).
 CHICK en MARTIN. *Kolloidchem. Beihefte* **5**, 49 (1913).
108. CORIN en ANSIAUX. *Bull. acad. roy. Belg.* (3) **21**, 321, 345 (1891).
 CORIN en BÉRARD. *Bull. acad. roy. Belg.* (3) **15**, 643 (1891).
109. PAULI. *Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. Path.* **10**, 53 (1907).
110. WU en YEN WU. *J. Biol. Chem.* **64**, 369 (1925).
111. COHNHEIM. *Chemie der Eiweiskörper*. Braunschweig 1911.
112. LLOYD. *Chemistry of the Proteins*, 228, 229. Philadelphia 1926.
113. MICHAELIS en RONA. *Biochem. Z.* **29**, 494 (1910).
114. SPIEGEL-ADOLF. *Biochem. Z.* **186**, 181 (1927); **204**, 1 (1929).
Naturwissenschaften **15**, 799 (1927).
 Zie ook: TEBB. *J. Physiol.* **30**, 25 (1903).
 ALEXANDER. *Colloid Chemistry* **II**, 320. New York 1928.
115. DENAYER. *Compt. rend. sci. brasserie Gand* **1**. Ref.: *Chem. Zentr.* **1891 I**, 509 en *J. Chem. Soc.* **60 II**, 1269 (1891).
116. WILLHEIM. *Biochem. Z.* **180**, 231 (1927).
Kolloid Z. **48**, 217 (1929).
117. ANSON en MIRSKY. *Colloid Symp. Mon.* **8**, 185 (1931).
118. PAULI. *Kolloid Z.* **3**, 2 (1908).
 PAULI en HANDOVSKY. *Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. Path.* **11**, 415 (1908).
 Zie ook: ETTISCH en SCHULZ. *Biochem. Z.* **259**, 418 (1933).
119. PAULI en WEISS. *Biochem. Z.* **233**, 381 (1931).
 PAULI. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **9**, 23 (1932).

120. SCHORR. *Biochem. Z.* **37**, 424 (1911).
 Zie ook: PAULI. *Kolloidchemie der Eiweiskörper*, **I**, 14, 32, 53, 78.
 Leipzig, Dresden 1920.
 PAULI en HANDOVSKY. *Biochem. Z.* **18**, 340 (1909).
 HANDOVSKY. *Kolloid Z.* **7**, 183 (1910).
 PAULI en STENZINGER. *Biochem. Z.* **205**, 71 (1929).
121. SPIRO. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **30**, 182 (1900).
Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. Path. **4**, 300 (1904).
122. LEPESCHKIN. *Kolloid Z.* **32**, 100 (1923).
 Zie ook: UTZINO. *Kolloid Z.* **47**, 244 (1929).
123. BEILINSSON. *Biochem. Z.* **213**, 399 (1929).
124. KRUYT en LIER. *Kolloidchem. Beihefte* **28**, 408 (1929).
125. H. L. BUNGENBERG DE JONG en KLAAR. *Trans. Faraday Soc.* **28**, 27 (1932).
126. JIRGENSONS. *Kolloid Z.* **41**, 331 (1927); **42**, 59 (1927); **44**, 76 (1928);
46, 114 (1928); **47**, 236 (1929); **61**, 41 (1932); **63**, 78 (1933).
Biochem. Z. **193**, 109 (1928); **195**, 134 (1928); **240**, 218 (1931).
Z. physik. Chem. A **158**, 56 (1931).
 Zie ook: PUPKO. *Kolloid Z.* **49**, 150 (1929); **54**, 170 (1931).
127. BOOTH. *Biochem. J.* **24**, 1699 (1930).
128. LOUGHLIN en W. C. Mc C. LEWIS. *Biochem. J.* **26**, 476 (1932).
129. Zie echter: VON KÚTHY. *Biochem. Z.* **259**, 432 (1933).

STELLINGEN

I

De proefnemingen, waaruit ETTISCH en SACHSSE afleidden, dat het paraglobuline een van de componenten der serumeiwitten is, maken eerder het tegendeel waarschijnlijk.

ETTISCH en SACHSSE. *Biochem. Z.* **230**, 129 (1931).

II

De interpretatie, welke ANGULESCU en POPESCU geven van hun experimenten over het hydrolyse-evenwicht van jodium, is aan bedenkingen onderhevig.

ANGULESCU en POPESCU. *Z. physik. Chem. A* **156**, 258, 304 (1931);
160, 466 (1932).

III

DJATSCHKOWSKY's opvatting omtrent het ontstaan van hoog disperse solen bij de verwarming van eiwitten wordt niet gesteund door zijn proefnemingen.

DJATSCHKOWSKY. *Kolloid Z.* **54**, 278 (1931).

IV

De door SIEBER en DIETMANN uitgevoerde proeven ter kwantitatieve bepaling van keukenzout in levensmiddelen, geven geen uitsluitsel omtrent de algemene bruikbaarheid der methode.

SIEBER en DIETMANN. *Z. Unters. Nahrungsm.* **62**, 266 (1931).

II

V

De voorstelling, welke REMESOV geeft van het ontstaan van vitamine *D* onder invloed van ultraviolette stralen, is niet waarschijnlijk.

REMESOV. Biochem. Z. **248**, 256; **250**, 560 (1932).

VI

De vervanging van de bepaling der vriespuntsdaling door die van het chloor-suiker-getal of van het breking-chloor-getal is voor de beoordeling van melk niet aan te bevelen.

BECKEL. Z. Unters. Nahrungs. **62**, 170 (1931); **64**, 126 (1932).

NOTTBOHM. Milchwirtsch. Forschungen, **1**, 345 (1924).

STRAUB. Chem. Weekblad, **23**, 142, 338 (1926); **24**, 111 (1927);

28, 425, 427 (1931); **29**, 349 (1932).

VII

SABALITSCHKA bewees niet, dat de esters van het *p*-oxybenzoëzuur conserveermiddelen zijn, welke voor algemene toepassing in aanmerking komen.

SABALITSCHKA en DIETRICH. Desinfection. **11**, 67, 94 (1926).

SABALITSCHKA. Schweiz. Apoth. Zg. **65**, 169 (1927); **67**, 157 (1929).

Apoth. Zg. **43**, 670 (1928). Z. angew. Chem. **42**, 936 (1929).

Ber. D. Pharm. Ges. **268**, 653 (1930). Pharm. Weekblad

68, 947 (1931). Pharm. Monatsh. **13**, 225 (1932).

ESCHENBRENNER. Pharm. Monatsh. **14**, 6, 36 (1933).

VELTHORST. Tijdschr. Hyg. Microbiol. Serol. **7**, 58 (1932). Pharm.

Monatsh. **13**, 199 (1932).

U
19