

an C zurückführt. Betrag des Defizit mehr als 1000 mg, so bestand rasche Ermüdbarkeit. Durch entsprechende C-Zufuhr stiegen Leistungsfähigkeit und Spannkraft. Auch *K. Wachholder*⁹⁵⁾ konnte eine Steigerung des Tagesverbrauches an Vitamin C bei Arbeitsleistung nachweisen, und zwar nicht nur bei Sportlern, sondern auch bei beruflicher körperlicher Tätigkeit. Es ist danach wahrscheinlich, daß vor allem in der C-armen Jahreszeit (Januar—April) ein beträchtlicher Teil der körperlich arbeitenden Bevölkerung infolge ungenügender C-Zufuhr nicht die volle Leistungsfähigkeit besitzt, ohne daß sich sonst irgendwelche Merkmale eines C-Mangels erkennen lassen.

Arbeitsphysiologisch näher untersucht ist der Zusammenhang zwischen Aneurin und Leistungsfähigkeit. *L. Csik* u. *J. Bencsik*⁹⁶⁾ stellten bei B-armer Kost einen schnelleren Anstieg der Ermüdung und eine geringere Leistungsfähigkeit als bei B-reicher Kost fest. *Miyama* fand Verminderung der Erschöpfung und Beschleunigung der Erholung durch B-reiche Kost⁹⁷⁾. Auch am isolierten Froschmuskel ließ sich eine Verzögerung der Ermüdung durch Zusatz von B₁ zur *Ringer*-Lösung beobachten⁹⁷⁾. Da Vitamin B₁ als Bestandteil der Carboxylase in den Kohlenhydratstoffwechsel eingreift, und sich kombinierte Vitamintraubenzuckerpräparate gut bewährt hatten⁹⁸⁾, untersuchte *W. Droese*¹⁰⁰⁾ den Einfluß auf die Leistungsfähigkeit im Zusammenhang mit der Zufuhr von Traubenzucker. Bei längere Zeit fortgesetzter Verabfolgung von B₁ in Mengen von

0,5—1 mg zeigten sich eine Vermehrung der roten Blutkörperchen, eine Erhöhung des Ruheblutzuckers und eine Verbesserung des Wirkungsgrades der Muskeltätigkeit (Methode 8). Als weiteres Zeichen der verbesserten Leistungsfähigkeit trat bei einigen Versuchspersonen Verringerung der Sauerstoffschuld (Methode 2) und des Atemvolumens (Methode 4) bei Standardarbeit ein. Bei der Bestimmung der maximalen Arbeit (Methode 1) wurde stets eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit durch B₁-Zulage beobachtet. Besonders interessant sind die Beobachtungen über die Verwertbarkeit einer Traubenzuckerzulage. B₁-normale Personen nützen die Traubenzuckerzulage unabhängig davon aus, ob sie gleichzeitig eine B₁-Zulage erhalten oder nicht. Personen dagegen, die B₁-arm ernährt sind, erfahren durch Traubenzuckerzulage allein keine Steigerung ihrer Leistungsfähigkeit, wohl aber dann, wenn sie gleichzeitig mit dem Traubenzucker B₁ erhalten. Dieser Zustand tritt schon bei einem B₁-Bestand des Körpers ein, den man sonst noch als normal zu bezeichnen pflegt.

Hieraus geht hervor, daß als Maß einer vollwertigen Ernährung nicht nur das Fehlen von äußerlich feststellbaren Mangelsymptomen verwendet werden darf. Man muß von der Ernährung verlangen, daß sie uns in den Vollbesitz derjenigen Fähigkeiten bringt, die ein jeder zur Erfüllung seiner beruflichen Aufgaben braucht. Wenn auch die bei uns übliche gemischte Kost diese Anforderungen im allgemeinen erfüllt, so sind doch die Ansichten über eine zweckentsprechende Ernährung sehr geteilt. Erst die weitere wissenschaftliche Erforschung der Zusammenhänge zwischen Ernährung und Leistungsfähigkeit wird uns in die Lage versetzen, die Ernährung nach den besonderen Erfordernissen der verschiedenen Berufe auszurichten.

Eingeg. 11. Dezember 1940. [A. 115.]

⁹⁵⁾ Z. Orthopäd. Grenzgeb. 69, Beilageheft 15 [1939].

⁹⁶⁾ Klin. Wschr. 1927 II, 2275.

⁹⁷⁾ Acta Scholae med. univ. imp. Kioto 14, 248 [1932].

⁹⁸⁾ H. J. Briem, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 242, 450 [1939].

⁹⁹⁾ Th. Morell, Dtsch. med. Wschr. 1940, 398.

¹⁰⁰⁾ Arbeitsphysiol. (im Druck).

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie^{*)}

8. Neuere Verfahren zur Reindarstellung von Proteinen

Von Dr. GERHARD SCHRAMM, Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie, Berlin-Dahlem

Die Darstellung einer chemisch reinen Verbindung setzt voraus, daß man neben geeigneten Trennungsverfahren auch die Möglichkeit besitzt, die Reinheit der Verbindung fortlaufend zu prüfen.

In der Proteinchemie versagen die meisten Methoden, die in der organischen Chemie zur Charakterisierung und Reinheitsprüfung eines Stoffes angewendet werden. So können Schmelzpunkt- und Siedepunktbestimmungen nicht benutzt werden. Auch die optische Drehung der Proteine ist wenig charakteristisch. Außerdem ist die experimentelle Bestimmung dieser in der organischen Chemie so wichtigen Größe schwierig, da die Proteinlösungen häufig trübe sind und daher nicht in genügend großen Schichtdicken gemessen werden können. Auch die analytische Zusammensetzung der Proteine ist untereinander sehr ähnlich, so daß die Konstanz der chemischen Zusammensetzung keine sicheren Schlüsse zuläßt. Die Analyse ist dazu noch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da wegen der starken Hydratisierung die Zusammensetzung von der Art der Trocknung abhängig ist. Man versucht aber, diese Schwierigkeit zu umgehen, indem man Angaben über die Zusammensetzung oder die biologische Wirksamkeit nicht auf Gramm Trockengewicht, sondern auf Gramm Protein-N bezieht.

Zur Charakterisierung und Prüfung der Proteine auf Einheitlichkeit müssen daher andere physikalische und chemische Konstanten herangezogen werden als in der Chemie der niedermolekularen Stoffe. Wir besitzen heute eine Anzahl von Verfahren, die gestatten, sichere und charakteristische Aussagen über ein Protein zu machen. In erster Linie sind hier die von *T. Svedberg*¹⁾ und seiner Schule entwickelten Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichts, der Sedimentationskonstante, der Diffusionskonstante sowie die Elektrophorese²⁾ zu nennen. Daneben hat sich aber noch eine Reihe anderer Verfahren bewährt. So kann man aus der Abhängigkeit der Löslichkeit eines Proteins von der zugefügten Salzkonzentration

Rückschlüsse auf die Einheitlichkeit ziehen³⁾. Als weitere Kriterien der Reinheit können die Konstanz der biologischen Wirksamkeit, der Löslichkeit, der Viscosität usw. herangezogen werden. Auch die Goldzahl nach *Zsigmondy* mag in manchen Fällen nützlich sein. Sie wurde von *Kausche* zur Kennzeichnung verschiedener Virusarten herangezogen⁴⁾. Zur Charakterisierung größerer Proteinkörper wird die elektronenoptische Untersuchung Bedeutung erlangen. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kann auf Abwesenheit von unerwünschten Molekülarten geprüft werden.

In der Eiweißchemie besitzt also das Bestreben des präparativen Chemikers, den gesuchten Stoff in kristallisiertem Zustand zu erhalten, nicht die überragende Bedeutung wie auf anderen Gebieten der Chemie. Dort besteht eines der sichersten und allgemeinsten Trennungsverfahren im „Umkristallisieren“, und die Konstanz des Schmelzpunkts bildet eines der wichtigsten Kriterien der Reinheit. Hierzu kommt noch, daß der Übergang in den kristallisierten Zustand an sich schon als Zeichen der Einheitlichkeit gewertet wird, da Beimengungen die Kristallisationsfähigkeit oft völlig unterbinden. Anders in der Eiweißchemie. Durch die große Oberfläche der Eiweißmoleküle und die starken Absorptionskräfte werden leicht Verunreinigungen in die Proteinkristalle eingeschlossen, wie Versuche mit zugesetzten Farbstoffen zeigen. Die Fähigkeit zur Bildung von Mischkristallen ist sehr groß. So kann z. B. das kristallisierte Serumalbumin durch weitere Fraktionierung in chemisch verschiedene Kristallate zerlegt werden, die bei Vermischung den kristallisierten Ausgangsstoff wieder ergeben. Außerdem werden die Proteine sehr leicht durch die chemischen Methoden, die zur Kristallisation führen, zerstört. So hat sich bei der Darstellung biologisch wirksamer Proteine, z. B. der Katalase, gezeigt, daß oft gerade die prächtigsten Kristalle unwirksam geworden waren. Diese Tatsachen, die bereits von *Tiselius*⁵⁾ u. a. betont wurden, führen dazu, daß in der Proteinchemie auch physi-

^{*)} Beitrag 7 dieser Reihe *Wittka*, „Molekulardestillation“, s. diese Ztschr. 53, 557 [1940].

¹⁾ Kolloid-Z. 85, 119 [1938].

²⁾ A. *Tiselius*, ebenda 85, 120 [1938].

³⁾ E. J. *Cohn*, Physiologic. Rev. 5, 349 [1925].

⁴⁾ Biol. Zbl. 59, 194 [1939].

⁵⁾ Svensk. kem. Tidskr. 50, 58 [1938] (in englischer Sprache).

kalische Methoden zur Isolierung berücksichtigt werden müssen, die, ohne zu einem Kristallinat zu führen, eine viel schonendere und vollkommene Reinigung erlauben als die chemischen Fällungsmethoden. Die physikalischen Verfahren werden sich ganz besonders da durchsetzen, wo es sich um die Darstellung natürlich vorkommender labiler Additionsprodukte handelt, da die chemisch dargestellten Endprodukte nicht ohne weiteres Schlüsse auf den ursprünglichen Zustand der isolierten Stoffe zulassen. Die chemischen Methoden werden hauptsächlich dort notwendig sein, wo es sich um die Darstellung größerer Mengen stabiler Proteine handelt. Besonders zur Gewinnung biologisch wirksamer Proteine sind sie unentbehrlich. Hier ist oft die Konzentration des Wirkstoffes so gering, daß der Stoff mit rein physikalischen Verfahren nicht nachweisbar ist. Außerdem gestatten diese nur die Verarbeitung verhältnismäßig kleiner Flüssigkeitsmengen. Die Proteine müssen daher zunächst unter Entfernung aller Ballaststoffe auf chemischem Wege konzentriert werden. Zur endgültigen Reinigung kann dann z. B. die Ultrazentrifugierung oder die Elektrophorese benutzt werden. Die chemische und physikalische Arbeitsweise ergänzen sich gegenseitig.

I. Chemische Methoden zur Darstellung von Proteinen.

Nachdem es lange Zeit hindurch als sehr schwierig galt, die Proteine, namentlich die Gewebeproteine, zum Kristallisieren zu bringen, wurden in den letzten Jahren zahlreiche biologisch wichtige Proteine auf chemischem Wege in kristallisierter Form erhalten. Diese Kristallinate erwiesen sich häufig bei der Prüfung in der Ultrazentrifuge oder bei der Elektrophorese bereits als einheitlich. In anderen Fällen konnten mit Hilfe dieser physikalischen Methoden die letzten Reste von Verunreinigungen entfernt werden.

Von diesen kristallisierten Proteinen können hier nur einige biologisch besonders interessante Substanzen erwähnt werden. 1926 erhielt Sumner⁶⁾ das erste kristallisierte Ferment, die Urease. In den darauffolgenden Jahren stellten besonders Northrop u. Kunitz⁷⁾ zahlreiche weitere Enzyme in kristallisierter und weitgehend reiner Form dar, so z. B. das Pepsin, das Trypsin und Chymotrypsin mit den Vorstufen Pepsinogen, Trypsinogen und Chymotrypsinogen. Weitere kristallisierte Fermente mit Proteinatur sind die Carboxypeptidase⁸⁾, Papain⁹⁾, Ficin¹⁰⁾, Amylase¹¹⁾ und Katalase¹²⁾. Durch die Arbeiten von Warburg¹³⁾, Negelein u. Mitarb. sind weitere Proteine in kristallisierter Form gewonnen worden, die in Verbindung mit besonderen prosthetischen Gruppen als Fermente der biologischen Oxydation und Reduktion eine wichtige Rolle spielen, so z. B. das Apoferment der Alkoholdehydrase (Diphosphopyridinprotein^{Alkohol, Acetaldehyd}), das Protein des oxydierenden Gärungsfermentes, sowie ein Kupferprotein, die Polyphenoloxydase. Insgesamt sind bisher etwa 12 Fermente kristallisiert erhalten worden. Auch das Gift der Klapperschlange, das Crotoxin, wurde von Slotta¹⁴⁾ in kristallisierter Form gewonnen und von Svedberg als einheitlich befunden.

Durch die Darstellung verschiedener pflanzlicher Virusarten in kristallisierter Form wurde in der Virusforschung ein wichtiger Fortschritt erzielt. Als erstes einheitliches Virusprotein wurde von Stanley¹⁵⁾ 1935 das Tabakmosaikvirus in Form von parakristallinen Nadeln gewonnen. Als erstes „echtes“ Kristallinat wurde von Bawden u. Pirie¹⁶⁾ das bushy stunt-Virus in Form von Dodekaedern gewonnen.

Alle diese Arbeiten erregten besonderes Interesse durch die Tatsache, daß es sich hier um Kristallinate von Proteinen handelte. Aus den oben angeführten Gründen ist aber dies nicht so entscheidend wie der Umstand, daß sich diese so dargestellten Stoffe auch bei der Prüfung mit physikalischen Mitteln, z. B. in der Ultrazentrifuge und bei der Elektrophorese als einheitlich erwiesen. Neben diesen Kristallinaten wurde auch eine ganze Reihe wichtiger Proteine in reiner, aber nicht kristallisierter Form gewonnen. Diese Stoffe haben vielfach den gleichen Reinheitsgrad wie die kristallisierten Proteine.

⁶⁾ J. biol. Chemistry **69**, 435 [1926].

⁷⁾ I. H. Northrop, J. gen. Physiol. **13**, 739 [1930]; I. H. Northrop u. M. Kunitz, ebenda **16**, 267 [1932]; M. Kunitz u. I. H. Northrop, ebenda **18**, 433 [1935]; I. H. Northrop u. M. Kunitz, Ergebn. Enzymforsch. **2**, 104 [1933].

⁸⁾ M. L. Anson, J. gen. Physiol. **20**, 663, 777, 781 [1937]; Ergebn. Enzymforsch. **7**, 118 [1938].

⁹⁾ A. K. Balls, H. Lineveaver u. R. R. Thompson, Science [New York] **66**, 379 [1937].

¹⁰⁾ A. Walti, J. Amer. chem. Soc. **60**, 493 [1938].

¹¹⁾ M. L. Caldwell, L. B. Bocher u. H. C. Sherman, Science [New York] **74**, 37 [1931].

¹²⁾ I. B. Sumner u. A. L. Dounce, ebenda **85**, 366 [1937].

¹³⁾ O. Warburg, Ergebn. Enzymforsch. **7**, 210 [1938].

¹⁴⁾ K. H. Slotta u. H. L. Fraenkel-Conrat, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1076 [1938].

¹⁵⁾ Science [New York] **81**, 644 [1935].

¹⁶⁾ Brit. J. exp. Pathol. **19**, 251 [1938].

Extraktion.

Die Extraktion der Eiweißstoffe aus tierischen und pflanzlichen Geweben erfolgt meist mit geeigneten Pufferlösungen. Durch Veränderung des p_H und der Salzkonzentration der Extraktionsflüssigkeit können verschiedene Proteinfraktionen nacheinander gewonnen werden. Bei der Extraktion tierischer Hormone werden oft Mischungen wäßriger Lösungen mit organischen Lösungsmitteln benutzt, so z. B. 50%iges Pyridin oder Mischungen mit Alkohol oder Aceton. Um die Zellen zu zerstören, wird das Gewebe vor der Extraktion meist eingefroren. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß einzelne Proteine durch das Einfrieren verändert werden. Manchmal ist es zweckmäßig, von einem Aceton-Trockenpulver des Gewebes auszugehen, da dies viel haltbarer ist als frisches Gewebe. Doch auch bei schneller Trocknung lassen sich autolytische Vorgänge nicht vermeiden. Manchmal sind diese aber geradezu erwünscht, z. B. bei der Freilegung von in der Zelle verankerten Enzymen. Autolytische Vorgänge spielen auch eine Rolle bei der „Auto-Extraktion“ des Pankreas, die sich bei der Darstellung verschiedener biologisch wichtiger Proteine des Pankreas bewährt hat^{7,8)}. Dabei läßt man das zerkleinerte und gefrorene Gewebe langsam auftauen und fängt die abtropfende Flüssigkeit auf; so erhält man die gesuchten Globuline verhältnismäßig frei von Beimengungen.

Die Aussalzmethode.

Diese am häufigsten gebrauchte Methode der Darstellung der Proteine geht zurück auf die Arbeiten von Hofmeister¹⁷⁾ im Jahre 1889, der dies Verfahren entwickelte und damit das erste kristallisierte Protein, das Serumalbumin, darstellte. Dieses wichtige Darstellungsverfahren hat sehr weite Anwendungsmöglichkeiten, da es auch von sehr empfindlichen Eiweißstoffen ohne Schädigung vertragen wird. Zum Aussalzen wird fast ausschließlich Ammonsulfat benutzt, weil wegen der leichten Löslichkeit des Salzes hohe Konzentrationen erreicht werden können und außerdem das zweiwertige Sulfat-Ion stärker ausfallende Wirkung hat als einwertige Anionen. Wenn aus bestimmten Gründen das NH_4 -Ion nicht erwünscht ist, kann man auch Magnesium- oder Natriumsulfat verwenden, doch nur bei nicht zu tiefen Temperaturen, da sonst nicht genügend Salz in Lösung geht¹⁸⁾. Einige besonders leicht lösliche Proteine lassen sich auch mit Ammonsulfat nur bei höherer Temperatur aussalzen. So fällt das Cytochrom C nur durch Ammonsulfatsättigung bei 60° vollständig aus¹⁹⁾. Durch Veränderung der Salzkonzentration und des p_H der Lösung können Fraktionierungen vorgenommen werden; durch häufiges Umfällen werden die Proteine vielfach schwerer löslich, hierdurch hat die Angabe eines Sättigungsgrades, bei dem ein bestimmtes Protein ausfällt, nur bedingten Wert. Weiterhin wird natürlich die Löslichkeit auch durch die Art der Beimengungen beeinflusst. Zur Reinigung löst man meist das Protein bei einem höheren p_H , als dem isoelektrischen Punkt entspricht, und fällt dann in der Nähe des isoelektrischen Punktes durch Ammonsulfatzusatz wieder aus.

Isoelektrische Fällung.

Bei Stoffen, die am isoelektrischen Punkt vollkommen unlöslich sind, erübrigt sich der Salzzusatz. So läßt sich z. B. das Insulin durch isoelektrische Fällung bei p_H 5,6 weitgehend reinigen. Zusätze von Saponin oder Digitonin sollen hierbei einen günstigen Einfluß auf die Kristallisierbarkeit haben^{20,21)}. Auch das Prolactin kann durch isoelektrische Fällung gereinigt werden. Hierzu wird das Hormon alkalisch extrahiert und dann die Lösung auf p_H 8 gebracht. Hierdurch fallen zunächst wenig wirksame Proteine aus. Durch Ansäuern auf p_H 5 erhält man dann eine Fällung, die das Prolactin in angereicherter Form enthält²¹⁾. Ebenso kann man saure Extrakte durch Zusatz von Alkali, Ammoniak oder Pyridin auf den isoelektrischen Punkt des gesuchten Proteins bringen und es hierdurch ausfällen. Nach Slotta¹⁴⁾ kristallisiert Crotoxin besonders gut, wenn man die essigsaure Lösung mit Pyridin bei einer Temperatur von 40° versetzt und die Lösung dann langsam abkühlen läßt.

¹⁷⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **14**, 165 [1889].

¹⁸⁾ R. A. Keckwick, Biochemic. J. **32**, 552 [1938].

¹⁹⁾ H. Theorell, Biochem. Z. **285**, 207 [1937].

²⁰⁾ C. E. Harrington u. D. A. Scott, Biochemic. J. **23**, 384 [1929].

²¹⁾ C. Bomskov: Methodik der Hormonforschung, Thieme, Leipzig 1939.

Einfluß der Temperatur auf die Fällbarkeit.

Die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit kann nur in seltenen Fällen zur Reinigung der Proteine benutzt werden, da man wegen ihrer Empfindlichkeit nur ein geringes Temperaturintervall zur Verfügung hat. Einige Pflanzenproteine, z. B. das Edestin, sind in warmen Salzlösungen leichter löslich als in kalten und können hierdurch umkristallisiert werden. Auch eine umgekehrte Temperaturabhängigkeit wird beobachtet. So kristallisiert das bushy stunt-Virus¹⁶⁾ oder das Serumalbumin bei Zimmertemperatur besser als in der Kälte. Die verschiedene Temperaturempfindlichkeit der Proteine läßt sich oft zu ihrer Reinigung ausnutzen. Ist das gesuchte Protein gegen Hitze beständig, so können die Begleitstoffe durch die Erwärmung denaturiert und somit aus der Lösung entfernt werden. Dies Verfahren hat sich z. B. bei der Reinigung der Pankreasenzyme bewährt. Durch Erwärmen auf 37° konnten unwirksame Begleitstoffe von der Carboxypeptidase abgetrennt werden⁸⁾. Auch beim Cytochrom C¹⁹⁾ gelang es durch Erhitzen auf 50°, eine Reinigung zu erzielen. Bei der Darstellung des Tabakmosaikvirus aus dem Tabaksaft kann das störende chloroplastenhaltige Material dadurch entfernt werden, daß man den Saft auf 70° erwärmt. Hierdurch flocken die Verunreinigungen aus. Dieselbe Wirkung erreicht man allerdings auch schon bei 35° oder durch Einleiten von Kohlensäure oder durch Chloroformzusatz²³⁾. Noch schonender ist vielleicht die Reinigung durch Einfrieren des Saftes auf -12°. Dadurch wird das Chloroplastenmaterial ebenfalls ausgeflockt²³⁾. Die Kälteeinwirkung wird vielleicht auch bei der Darstellung tierischer Proteine anwendbar sein.

Fällung mit organischen Lösungsmitteln.

Die Eiweißstoffe lassen sich weiterhin durch Zusatz von organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln ausfällen. Einige Proteine sind allerdings noch in 70—90%igem Alkohol löslich, in reinem Alkohol und Aceton dagegen vollständig unlöslich. Zu den in wäßrigem Alkohol löslichen Proteinen gehören einige pflanzliche Samenproteine wie Gliadin (Weizen) und Hordein (Gerste). Auch die Hypophysenhormone sind in verhältnismäßig hoch konzentrierten Alkohollösungen löslich, ebenso das Insulin, das außerdem auch in Methanol und Eisessig löslich ist. Am häufigsten werden als Fällungsmittel Alkohol oder Aceton verwendet. Die Katalase kann auch durch Fällung mit Dioxan gereinigt werden¹²⁾.

Bei Verwendung der Lösungsmittelfällung werden viele Proteine geschädigt und unlöslich. Als Ausnahme ist der von Negelein²⁴⁾ angegebene Fall zu betrachten, der durch 20%igen Alkoholzusatz die Stabilität des Proteins des Triphosphopyridinproteids_{Robisonester} erhöhen konnte. Vielleicht handelt es sich hier um eine Hemmung eines zerstörenden Fermentes.

Darstellung schwerlöslicher Verbindungen der Proteine.

Hierzu können Schwermetallsalze benutzt werden, wie Bleiacetat und Silberacetat, oder Basenfällungsmittel, wie Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure, Tannin u. a. Die Pikrinsäurefällung wurde z. B. zur Reinigung des Insulins und des thyreotropen Hormons²¹⁾ der Hypophyse benutzt. Auch bei der Darstellung verschiedener Protamine leistet sie gute Dienste. Diese Fällungsmittel können jedoch nur in beschränktem Umfange benutzt werden, da die Proteine sehr häufig hierdurch denaturiert werden. Durch vorsichtige Anwendung z. B. der Schwermetallsalze ist es aber oft gelungen, eine Reinigung zu erzielen.

Die Schwerlöslichkeit von Nucleinsäureverbindungen der Proteine wurde von Warburg²⁵⁾ zur Reindarstellung eines Fermentproteins benutzt. Aus dem schwerlöslichen Nucleoprotein wurde das Protein durch Zugabe eines Protamins (Sturin) wieder in Freiheit gesetzt. Eine andere Gruppe spezieller schwerlöslicher Verbindungen stellen die Präcipitate dar, die sich bei der serologischen Reaktion von Antigen und Antikörper bilden. Aus diesen Präcipitaten gelingt

es oft, den Antikörper wieder in Freiheit zu setzen und so in reiner Form zu gewinnen. Diese Methode wurde insbes. von Heidelberger²⁶⁾ zur Reindarstellung spezifischer Antikörper benutzt.

Die Adsorptionsmethode.

Als Adsorptionsmittel können die gebräuchlichen Stoffe, wie Aluminiumhydroxyd, aktive Kohle, Bariumsulfat usw. benutzt werden. Auch organische Adsorbentien (Cellophan¹⁹⁾) finden Anwendung; so kann Cholesterin zur Adsorption der Lipase benutzt werden, und die Benzoesäure ist ein gutes Adsorbens für Insulin und für die gonadotropen Hormone der Hypophyse. Meistens wird eine Fällung des Adsorbens in der Proteinlösung selbst erzeugt, z. B. durch Ansäuern einer Natriumbenzoatlösung. Infolge der starken Adsorptionskräfte der Proteine werden diese leicht adsorbiert, schwieriger ist es, sie wieder zu eluieren. Hierzu werden Lösungen mit extremen pH, gegebenenfalls unter Zusatz von Lösungsmitteln benutzt. Die chromatographische Adsorptionsanalyse nach Tswett ist bisher in der Eiweißchemie noch wenig angewendet worden. Nach Angaben von Zechmeister, Toth u. Balint²⁷⁾ ist es möglich, die Enzyme des Emulsins nach diesem Verfahren zu trennen.

Bei allen auf chemischem Wege dargestellten Verbindungen ist ihre Einheitlichkeit durch geeignete physikalische Methoden nachzuprüfen. Falls sich hierbei ihre Uneinheitlichkeit zeigt, wird es in den meisten Fällen gelingen, sie auf physikalischem Wege weiter zu reinigen.

II. Physikalische Methoden zur Reindarstellung von Proteinen.

1. Die Ultrazentrifugierung.

Die Untersuchungen, die mit der Ultrazentrifuge ausgeführt wurden, haben einen entscheidenden Einfluß auf die neuere Entwicklung der Proteinchemie gehabt. Als wichtigstes Ergebnis muß nach Svedberg¹⁾ die Erkenntnis gelten, daß die Proteine in der Lösung als einheitliche Teilchen definierter Zusammensetzung vorliegen. Die natürlich vorkommenden Proteine sind entweder monodispers oder paucidisers, d. h. sie bestehen aus wenigen Arten von einheitlichen Molekülen. Dadurch wird die Untersuchung und Charakterisierung der einzelnen Eiweißkörper wesentlich erleichtert. Die Kräfte, die den Zusammenhalt der Proteinmoleküle bewirken, sind oft recht gering. Dies führt zu Dissoziations- und Assoziationsvorgängen, die in bestimmten einfachen stöchiometrischen Verhältnissen verlaufen. Es ist auch für den präparativen Chemiker wichtig, diese Möglichkeiten bei seiner Arbeit zu berücksichtigen. Ein weiteres Ergebnis von größtem theoretischen Interesse ist die Auffindung von bestimmten Regelmäßigkeiten in der Molekülgröße des Proteins, welche auf eine gemeinsame Aufbauanlage der Proteinmolekel deuten.

Einzelne Ultrazentrifugentypen.

Zur Lösung allgemein kolloidchemischer Fragen wurde von Svedberg (1923) eine Zentrifuge konstruiert, bei der durch geeignete optische Einrichtungen die Sedimentation des gelösten Stoffes während der Rotation verfolgt werden kann, die „Ultrazentrifuge“. Sie wurde im Laufe der letzten Jahre bis zur höchsten Vollkommenheit entwickelt. Es gelingt, Schwerefelder zu erzeugen, die nahezu das Millionenfache der Erdbeschleunigung betragen, so daß auch niedermolekulare Stoffe zur Sedimentation gebracht werden können. Über die Wirkungsweise und den Aufbau der Ultrazentrifugen wurde bereits in dieser Zeitschrift von v. Mutzenbecher²⁸⁾ berichtet, so daß hier einige Hinweise genügen.

Die Svedbergsche Ultrazentrifuge wird durch Ölturbinen angetrieben, die Drehung erfolgt um eine horizontale, festgelagerte Achse. Neben der Ölturbine, die für höchste Leistungen geeignet ist, wurde von Svedberg auch eine Zentrifuge mit elektrischem Antrieb für Tourenzahlen bis 20 000 U/min entwickelt, die hauptsächlich zur Bestimmung von Sedimentationsgleichgewichten dient. Von Beams, Pickels, Wyckoff u. a. wurde, auf dem Prinzip des Luftkreisels von Heriot u. Hugonard aufbauend, eine Ultrazentrifuge mit Luftantrieb entwickelt. Der Rotor hängt hier an einer ver-

²²⁾ E. Pfannkuch u. G. A. Kausche, *Biochem. Z.* **299**, 334 [1938].

²³⁾ G. Schramm u. H. Müller, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 43 [1940].

²⁴⁾ *Biochem. Z.* **287**, 381 [1936].

²⁵⁾ O. Warburg u. W. Christian, ebenda **303**, 40 [1939].

²⁶⁾ M. Heidelberger u. F. E. Kendall, *J. exp. Medicine* **64**, 161 [1933].

²⁷⁾ Unveröffentlichte Versuche, zitiert nach L. Zechmeister u. L. von Cholnoky: Die chromatographische Adsorptionsmethode. 2. Aufl. Jul. Springer, Wien 1938.

²⁸⁾ Diese *Ztschr.* **51**, 633 [1938].

tikalen, biegsamen Stahlachse. [Hierdurch kann er sich von selbst ausbalancieren. Die Auswuchtung braucht also nicht mit so großer Genauigkeit zu erfolgen wie bei der festgelagerten Ölturbinenzentrifuge. Nach dem gleichen Prinzip wurde eine luftgetriebene²⁹ Ultrazentrifuge auch von G. Schramm²⁹) gemeinsam mit den Physikalischen Werkstätten in Göttingen gebaut. Bei dieser Zentrifuge ist der Rotor austauschbar, so daß die Zentrifuge sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke benutzt werden kann²⁹).

Analytische Untersuchungen.

Die Ultrazentrifuge ist eines der wichtigsten Hilfsmittel zur Charakterisierung der Proteine und zur Prüfung auf ihre Einheitlichkeit. Schon in einer kleinen Probe der zu untersuchenden Lösung von etwa 0,5 cm³ können die Anzahl der vorhandenen Proteinkomponenten, ihre Einheitlichkeit und die Sedimentationskonstante jeder einzelnen Komponente bestimmt werden. Aus der Sedimentationskonstante kann das Molekulargewicht berechnet werden unter der Voraussetzung, daß es sich um kompakte kugelförmige Moleküle handelt. Unter Zuhilfenahme der auf andere Weise bestimmten Diffusionskonstante kann aus der Sedimentationskonstante das Molekulargewicht unabhängig von Form und Hydratation der Moleküle errechnet werden. Dieses kann nach einer zweiten unabhängigen Methode auch aus dem Sedimentationsgleichgewicht bestimmt werden. Näheres über diese Verfahren findet sich in der von T. Svedberg u. K. O. Pedersen veröffentlichten Monographie³⁰).

Präparative Anwendung der Ultrazentrifuge.

Eine besondere Konstruktion der Zelle ermöglicht auch die Anwendung der Ultrazentrifuge für präparative Zwecke in kleinem Maßstabe³¹.

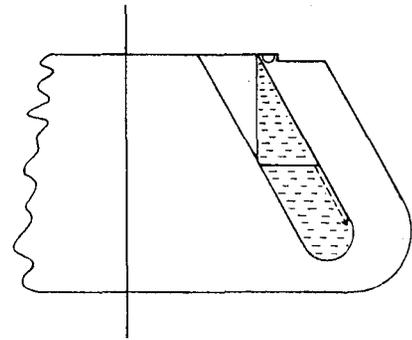
Durch den Einbau eines mit Löchern versehenen Steges, der während des Versuches mit Filtrierpapier bedeckt wird, wird die untersuchte Flüssigkeitsmenge in zwei Schichten getrennt (Abb. 1). Nach Beendigung des Versuches kann die leichtere Komponente aus der oberen Flüssigkeitsschicht gesondert von der in der unteren Schicht befindlichen schweren Komponente entnommen werden. Die Trennzelle bewährte sich bei der Abtrennung der kristallisierten Katalase. In einem nach den Vorschriften von Sumner u. Dounce¹²) dargestellten Präparat aus Leber fanden Sumner u. Gralèn³²) eine homogene Substanz mit der Sedimentationskonstante

$s_{20} = 11,3 \cdot 10^{-13}$, leicht verunreinigt mit einem Material von höherem Molekulargewicht. Ein Versuch in der Trennzelle zeigte, daß die enzymatische Aktivität an die leichtere Substanz gebunden war. Ähnliche Trennzellen können natürlich auch in anderen Ultrazentrifugen Verwendung finden, so z. B. in der Ultrazentrifuge mit elektrischem Antrieb oder in der luftgetriebenen Ultrazentrifuge.

Die Verwendung der Ölturbinenzentrifuge zur präparativen Darstellung größerer Proteinmengen stößt auf gewisse Schwierigkeiten, während die luftgetriebene Zentrifuge für präparatives Arbeiten besonders geeignet ist. Unter Verzicht auf die Beobachtung des Sedimentationsvorganges während der Rotation wurden von Pickels, Bauer u. Wyckhoff für die luftgetriebene Zentrifuge besondere Rotoren gebaut, die gestatten, größere Flüssigkeitsmengen bis zu etwa 100 cm³ zu verarbeiten.

In dem Drehkörper aus einer Spezialaluminiumlegierung befinden sich sechs schräge Bohrungen, die zur Aufnahme der Flüssigkeit dienen. Die Flüssigkeit kann entweder unmittelbar in die Bohrungen eingefüllt werden oder auch in Becher aus einem biegsamen Kunststoff. Der Wirkungsgrad bei Benutzung eines derartiger Rotors ist sehr groß, denn der sedimentierende Stoff braucht nur eine verhältnismäßig kurze Strecke zurückzulegen. An der Außenwand der Hohlräume setzt sich das Sediment in groben Flocken ab, die schnell zu Boden sinken. Der Weg, den der sedimentierende Stoff zurücklegt, ist aus Abb. 2 zu ersehen.

Bei der von den Physikalischen Werkstätten gebauten Zentrifuge beträgt das Fassungsvermögen jedes Hohlraumes höchstens 15 cm³, so daß insgesamt 90 cm³ Flüssigkeit verarbeitet werden können. Zur Ausführung eines Versuches wird der Rotor mit einem Deckel vakuumdicht verschlossen und an der biegsamen vertikalen Achse des eigentlichen Antriebsmechanismus befestigt. Der Drehkörper rotiert im Vakuum, so daß keine nennenswerte Erwärmung auftritt. Soll die Aufarbeitung in der Kälte vorgenommen werden, so kann der Rotor vor dem Versuch im Kühlschrank abgekühlt werden.



Drehachse

Mit diesem Rotor werden Zentrifugalkraftfelder von etwa 100 000 g erreicht. Nach Wyckhoff³³) lassen sich Schwerfelder erzeugen, die das 250 000 bis 300 000fache der Schwerkraft betragen, so daß alle Eiweißstoffe, die schwerer sind als Eieralbumin (M = 45 000), aus ihrer Lösung ausgeschleudert werden können.

Die luftgetriebenen, schnell rotierenden Zentrifugen haben besonders zur Darstellung hochmolekularer Eiweißstoffe, insbes. der Virusproteine, Verwendung gefunden, die auf diese Weise leicht von den niedermolekularen unwirksamen Begleitstoffen abgetrennt werden können. So gelang es Beard u. Wyckhoff³⁴) durch wiederholte Ultrazentrifugierungen, aus dem Shope-Papillom des Kaninchens einen einheitlichen hochinfektiösen Eiweißstoff mit einem Molekulargewicht von etwa 25 000 000 zu gewinnen.

Die Reinigung des Papillom-Virus erfolgte so, daß das Sediment aus der hochtourigen Zentrifuge in einer Pufferlösung aufgenommen wurde und auf einer gewöhnlichen Laboratoriumszentrifuge ungelöste Proteinflocken entfernt wurden. Die überstehende klare Lösung wurde wiederum ultrazentrifugiert und der ganze Vorgang mehrmals wiederholt. Auf ähnliche Weise läßt sich auch aus dem Kaninchenmyxom eine infektiöse schwere Proteinfraktion gewinnen³⁵).

Ganz besonders erfolgreich war die Anwendung der Zentrifugierung pflanzlicher Virusproteine. So kann das Tabakmosaikvirus aus dem Saft der infizierten Pflanzen unmittelbar in einheitlicher Form gewonnen werden. Durch 1½stündiges Zentrifugieren bei einer Drehzahl von 25 000 pro Minute ist das Tabakmosaikvirus zu über 99% abgeschleudert. Zur Darstellung größerer Mengen empfiehlt es sich, vor der Ultrazentrifugierung das Virusprotein durch Ausfällung mit Ammonsulfat und Wiederaufnehmen in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen zu konzentrieren. Nach diesem Verfahren gelang es, z. B. das Tomatenmosaikvirus auf einfache Weise in größerer Menge zu gewinnen, während die rein chemische Darstellung dieses Virus durch wiederholte Ammonsulfatfällungen infolge der großen Menge an Begleitstoffen sehr umständlich ist³⁶).

Zur Darstellung sehr hochmolekularer Proteine, z. B. der Virusproteine, wurden auch kontinuierlich arbeitende, hochtourige Zentrifugen vom Sharpless-Typ mit Erfolg verwendet, doch ist es bei diesem kontinuierlichen Betrieb nicht so leicht möglich, die von Fall zu Fall am besten geeigneten Versuchsbedingungen einzuhalten.

2. Die Elektrophorese.

Bei der Ultrazentrifugierung erfolgt die Charakterisierung und Trennung der Proteine nach ihrer Masse. Die Elektrophorese bildet nun eine wichtige Ergänzung, da bei ihr die elektrische Ladung der Teilchen ausschlaggebend ist. Viele Proteine, die die gleiche Masse besitzen, wie z. B. die Serumglobuline, lassen sich in der Ultrazentrifuge nicht unterscheiden, während sie sich bei der Elektrophorese auf Grund ihres verschiedenen elektrochemischen Verhaltens ohne weiteres trennen lassen. Moleküle mit gleichem Oberflächenpotential, aber verschiedener Masse, wie z. B. die Assoziations-

²⁹) Vgl. a. Chem. Fabrik 13, 404 [1940].

³⁰) Die Ultrazentrifuge, Verlag Steinkopff, Dresden 1940.

³¹) A. Tiselius, K. O. Pedersen u. T. Svedberg, Nature [London] 140, 848 [1937].

³²) Science [New York] 87, 284 [1938].

³³) Naturwiss. 25, 481 [1937].

³⁴) Science [New York] 85, 201 [1937].

³⁵) G. Schramm, Naturwiss. 27, 149 [1939].

³⁶) G. Melchers, G. Schramm, H. Trurnit u. H. Friedrich-Freksa, Biol. Zbl. 60, 524 [1940].

produkte des Tabakmosaikvirus, verhalten sich bei der Elektrophorese einheitlich, lassen sich dagegen in der Ultrazentrifuge unterscheiden²⁹). Wenn ein Protein sich bei der Ultrazentrifugierung und bei der Elektrophorese einheitlich verhält, besteht ein hoher Grad von Wahrscheinlichkeit, daß wir es mit einem reinen Stoff zu tun haben. Die Trennung verschiedener Proteine wird nur dann unmöglich sein, wenn die Unterschiede lediglich sterisch bedingt sind, etwa durch die Reihenfolge der enthaltenen Aminosäuren. Solche Unterschiede lassen sich meist nur immunologisch nachweisen. Dagegen können biologisch nahe verwandte Eiweißstoffe in elektrochemischer Hinsicht sehr verschieden sein. So erwähnt *Tiselius*⁵) einen Versuch von *G. S. Adair*, bei dem sich das Hämoglobin des Foetus und der Mutter beim Schaf elektrophoretisch unterscheiden ließ. Auch bei der Unterscheidung nahe verwandter Virusarten, z. B. des Tabakmosaik- und Tomatenmosaikvirus³⁶), leistet die Elektrophorese gute Dienste. Kleine Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit lassen sich am besten in einer Mischung der beiden Proteine nachweisen. Die Verschiedenheit gibt sich dann in dem Auftreten von zwei wandernden Grenzzonen zu erkennen. Dies Verfahren ersetzt also in gewisser Hinsicht den Mischschmelzpunkt.

Die elektrophoretische Analyse ist besonders geeignet, um die fortschreitende Reinigung und Entfernung von Begleitstoffen im Laufe einer Proteindarstellung zu verfolgen. Hierzu ist es meistens nicht nötig, die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Stoffe zu bestimmen. Zur Charakterisierung eines rein dargestellten Proteins wird die Wanderungsgeschwindigkeit des Stoffes bei verschiedenen pH und gleicher Ionenkonzentration bestimmt. Man erhält auf diese Weise eine Beweglichkeitskurve. Bei genügend hohem pH sind die Proteine negativ geladen und wandern zur Anode (negative Wanderungsgeschwindigkeit), im sauren Gebiet ist die Ladung positiv und die Wanderung erfolgt zur Kathode (positive Wanderungsgeschwindigkeit). Im Schnittpunkt der Beweglichkeitskurve mit der Nulllinie liegt der isoelektrische Punkt, der für jedes Protein charakteristisch ist. Zur Kennzeichnung wird weiterhin die Neigung der Beweglichkeitskurve in der Nähe des isoelektrischen Punktes herangezogen. Weiter gehende Schlüsse lassen sich aus diesen Messungen zurzeit noch nicht ziehen, da die Wanderungsgeschwindigkeit von den verschiedensten Faktoren abhängig ist. Jedoch sind in letzter Zeit erfolgversprechende Versuche gemacht worden, die theoretischen Grundlagen der Elektrophorese von Eiweißstoffen näher aufzuklären.

Die ideale Beweglichkeit u_i ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$u_i = \frac{F \cdot Z_p \cdot 3 \cdot 10^{-9}}{f \cdot 3 \cdot 10^{-2}} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (I)$$

F = Faraday-Konstante, Z_p = Valenz des Proteinions, f = molarer Reibungskoeffizient.

Zur Prüfung dieser Gleichung wurde von *Tiselius*³⁷) beim Eialbumin die Valenz des Proteins durch Messung des Membranpotentials nach *Adair* u. *Adair* bestimmt. Der molare Reibungskoeffizient f wurde aus der Diffusionskonstante berechnet. Es zeigte sich, daß die experimentell bestimmte Beweglichkeit bei höherer Ionenstärke kleiner war als nach Gl. (I). Der hemmende Einfluß der entgegengesetzt geladenen Ionenatmosphäre, die das Protein-Ion umgibt, ließ sich aus der *Debye-Hückelschen* Theorie berechnen. Die auf diese Weise ermittelten Beweglichkeiten stehen in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den experimentell gefundenen Werten. Die Valenz der Protein-Ionen läßt sich auch durch das Bindungsvermögen für Säuren und Basen bestimmen, jedoch stimmt dieser Wert, besonders in Gegenwart von Salzen, nicht genau mit dem nach der Membranpotentialmethode ermittelten Wert überein, da die Proteine Ionen, besonders Anionen, aus ihrer Umgebung adsorbieren. Aus demselben Grund ist auch der isoelektrische Punkt etwas von der Salzkonzentration abhängig. Jedoch wird das Oberflächenpotential der Eiweißstoffe in erster Linie durch die chemische Natur des Proteins bestimmt. Die Aufladung durch adsorbierte Ionen ist bei diesen stark polaren Substanzen von weit geringerer Bedeutung als bei ungeladenen Kolloidpartikelchen, deren Oberflächenpotential z. T. ausschließlich durch die adsorbierten Ionen bestimmt wird.

²⁹) *A. Tiselius* u. *H. Svensson*, Trans. Faraday Soc. **36**, 16 [1940].

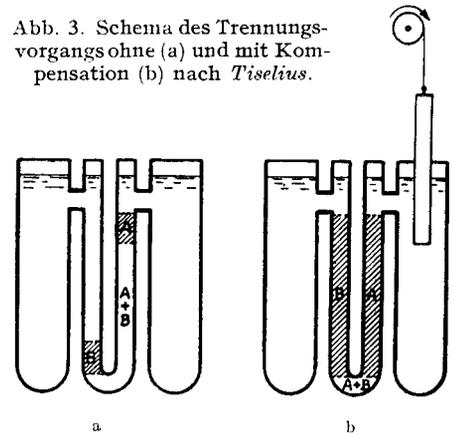
Die Reindarstellung von Proteinen durch Elektrophorese.

Der Vorteil dieser Methode besteht, ähnlich wie bei der Zentrifugierung, darin, daß sie außerordentlich schonend ist. Sie kann daher auch zur Gewinnung sehr labiler Verbindungen benutzt werden. Die gegenseitige Beeinflussung der Substanzen bei der Elektrophorese tritt nur dann ein, wenn sich vollkommen undissoziierte Verbindungen bilden. Bei den Proteinen wurden derartige Reaktionen untereinander nur bei den stark basischen Histonen beobachtet. Hierdurch ergibt sich bei der präparativen Darstellung der Vorteil, daß die Abtrennung unabhängig ist von der Menge der vorhandenen Begleitsubstanzen.

Der Trennungsvorgang im Elektrophoreseapparat verläuft folgendermaßen:

Die im unteren Teil eines U-Rohres befindliche Proteinlösung wird vorsichtig mit einer geeigneten Pufferlösung, die der Stromleitung dient, überschichtet. Beim Anlegen einer Spannung wandern nun die in der Proteinlösung vorhandenen Komponenten mit verschiedenen Geschwindigkeiten zur Anode oder Kathode. Am Anfang und am Ende der sich bewegenden Proteinsäule bildet sich auf diese Weise eine Schicht, die die reinen Proteinkomponenten enthält (Abb. 3). Durch eine geeignete Vorrichtung kann also bei jedem Elektrophoreseversuch ein bestimmter Betrag der schnellsten Komponente am Anfang und der langsamsten Komponente am Ende der Säule in reiner Form abgetrennt werden. Die Trennung ist um so vollständiger, je größer der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit ist, und je länger und schneller die Komponenten wandern.

Abb. 3. Schema des Trennungsvorgangs ohne (a) und mit Kompensation (b) nach *Tiselius*.



Die Trennung ist um so vollständiger, je größer der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit ist, und je länger und schneller die Komponenten wandern.

Ein allgemein anwendbarer Elektrophoreseapparat muß also folgenden Anforderungen entsprechen:

1. Es muß eine möglichst hohe Strombelastung möglich sein.
2. Das Auftreten von Wärmekonvektionen muß vermieden werden.
3. Die an den reversiblen Elektroden auftretenden Stoffe dürfen nicht zu der Versuchslösung gelangen.
4. Die Wanderung der Komponenten muß verfolgt werden können.

Diesen Forderungen werden die Konstruktionen von *H. Theorell* und *A. Tiselius* gerecht. Es sind zwar auch mit einfacheren Apparaten wertvolle Untersuchungen ausgeführt worden, so z. B. von *Bennhold*³⁸); doch sollen hier nur die zur Trennung von Proteinen besonders geeigneten Anordnungen besprochen werden.

Elektrophoreseapparat nach *Theorell*.

Von *Theorell*^{39, 40}) wurden zwei verschiedene Elektrophoreseapparate entwickelt, von denen der eine für Untersuchungszwecke und der andere für präparative Zwecke bestimmt ist.

Der Apparat für Untersuchungszwecke ist nach dem U-Rohr-Prinzip gebaut (Abb. 4). Das U-förmige Bodenstück (a) ruht auf einem verstellbaren Metallhalter (b). Auf den freien plangeschliffenen Enden des Bodenstückes sind abwechselnd durchlochte Hartgummischeiben und hohlzylindrische Glaszellen gelagert, so daß die Schenkel des U-Rohrs aus je 6 Fächern bestehen, die durch Drehung der Hartgummischeiben voneinander getrennt werden können. Hierdurch ist es möglich, nach Beendigung des Versuches den Inhalt der Zellen getrennt voneinander zu analysieren. Auf der obersten Hartgummischeibe sind die Zwischenstücke (c) durch doppelt wirkende Schrauben befestigt (d). In die oberen Enden der Zwischenstücke sind die Seitenröhren der Elektrodengefäße (e) kugelgelenkförmig eingeschliffen und durch Gummischläuche mit den Zwischenstücken verbunden. Der Apparat wird durch die Achse (f) zusammengehalten. Durch die Hähne (g) erfolgt der hydrostatische Druckausgleich vor Beginn des Versuches. Die reversiblen Silber-Silber-

³⁸) *Kolloid-Z.* **85**, 171 [1938]. ³⁹) *Biochem. Z.* **275**, 1 [1935]. ⁴⁰) *Ebdem* **278**, 291 [1935].

chlorid-Elektroden sind durch ein größeres Volumen Pufferlösung von der Untersuchungsflüssigkeit getrennt. Durch eine gleichmäßige Formgebung des U-Rohrs wird für einen definierten Spannungsabfall in dem Rohr gesorgt.

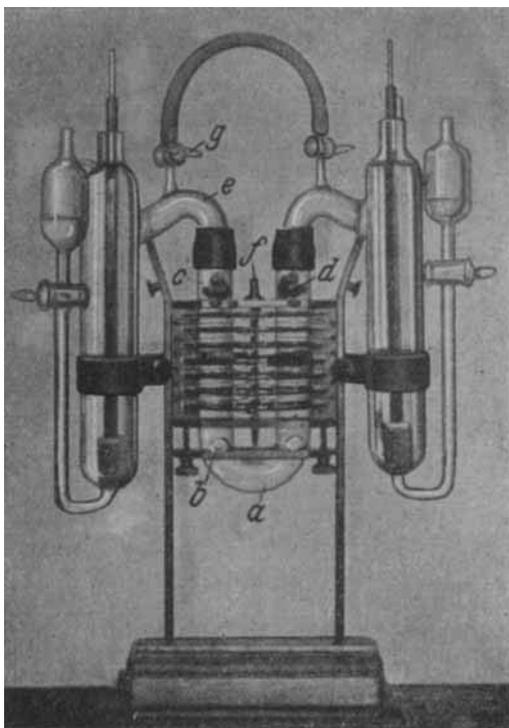


Abb. 4. Elektrophoreseapparat für Untersuchungszwecke nach Theorell.

Die Konvektionen lassen sich bei dieser Ausführung anscheinend nicht vollständig vermeiden. Der Apparat hat sich bei der Reindarstellung des gelben Fermentes und des Cytochroms bewährt. Er wird besonders dort brauchbar sein, wo der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Stoffe beträchtlich ist, so z. B. bei der Abtrennung von Eiweißstoffen von nicht polaren und daher nicht wandernden Kohlenhydraten. Die Wanderungsgeschwindigkeit läßt sich optisch nur bei gefärbten Stoffen verfolgen. Sie wird i. allg. durch Analyse der in den einzelnen Kammern enthaltenen Substanzmengen bestimmt.

Der Kathaphoreseapparat für präparative Zwecke entspricht in seinem Grundgedanken mehr dem Grenzfall der Elektrophorese, der Elektrodialyse, die bekanntlich angewendet wird, um schnell wandernde Elektrolyte aus Proteinlösungen abzuscheiden, wobei das Protein durch halbdurchlässige Membranen daran gehindert wird, zu den Elektroden zu gelangen.

Bei dem Apparat für präparative Zwecke (Abb. 5) wurde statt des U-Rohrs ein vertikales weites Rohr (A) gewählt, das durch ein

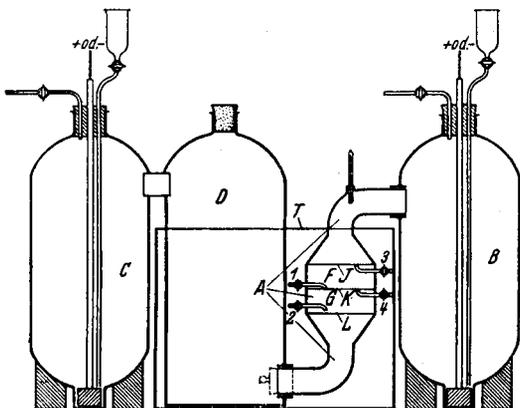


Abb. 5. Elektrophoreseapparat für präparative Zwecke nach Theorell.

zwischen geschaltetes Gefäß (D) mit Pufferlösung von den Elektrodengefäßen (C und B) getrennt ist. Das Rohr (A) wird oben und unten gegen die Pufferlösungen durch die Pergamentmembranen (I und L) abgegrenzt und durch ein zwischen den Membranen liegendes Filtrierpapier (K) in die beiden Kammern (F und G) geteilt. Diese Membranen haben den Zweck, eine Vermischung der Flüssigkeit zu verhindern. Vor Beginn des Versuches wird zunächst der ganze Apparat mit Pufferlösung gefüllt und dann in die obere Kammer (F) durch den Hahn 1 die zu untersuchende Lösung zugegeben, wobei man ein entsprechendes Volumen der Pufferlösung aus 3 abfließen läßt. Nach dem Anlegen der Spannung wandert dann der zu reinigende Stoff in die untere Kammer (G). Nach Beendigung des Versuches wird zunächst die obere Kammer (F) entleert und die gereinigte Lösung durch Hahn 2 aus der unteren Kammer (G) entnommen, wobei durch 4 Luft eingelassen wird. T ist ein Thermostat, der mit fließendem Leitungswasser oder Eiswasser gefüllt wird.

In dem Apparat können 350 cm³ Flüssigkeit verarbeitet werden. Eine Trennung wird auch hier nur möglich sein, wenn die Wanderungsgeschwindigkeiten sehr verschieden sind oder entgegengesetztes Vorzeichen haben.

Elektrophoreseapparat nach Tiselius^{2,5, 41}).

Dieser Apparat weist gegenüber den besprochenen Konstruktionen eine Reihe von Vorzügen auf. Bisher wurden drei Modelle von Tiselius entwickelt, u. zw. für 2, 11 und 150 cm³ Lösung⁴²). Zur Vermeidung von Konvektionen schlägt Tiselius vor, die Elektrophoreseversuche bei + 4° auszuführen. Konvektionsströme treten stets da auf, wo infolge von Temperaturschwankungen Dichteunterschiede in der Flüssigkeit auftreten. In diesem Temperaturgebiet variiert aber die Dichte des Wassers nur wenig mit der Temperatur. Weiterhin wurde von Tiselius statt des bisher benutzten runden Querschnitts ein schmaler rechteckiger Querschnitt des U-Rohrs gewählt, da hierdurch ein schnellerer Wärmeaustausch mit dem Thermostaten stattfinden kann. Durch Anwendung optischer Methoden wird außerdem jede einzelne, auch ungefärbte Proteinkomponente sichtbar gemacht. Am einfachsten und für die meisten Zwecke ausreichend ist die Anwendung der Toeplerschen Schlierenmethode, bei der die wandernden Grenzzone als dunkle Bande beobachtet werden. Falls gleichzeitig auch die Konzentrationen der einzelnen Komponenten bestimmt werden sollen, muß die allerdings recht umständliche Skalenmethode angewendet werden. Zur Konzentrationsbestimmung können

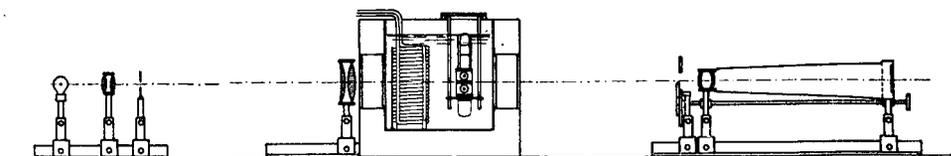


Abb. 6. Optische Anordnung des Elektrophoreseapparates nach Tiselius.

Von links nach rechts: Lampe, Kondensator, Beleuchtungsspalt, Schlierenkopfobjektiv, Apparat im Thermostaten, Schlierenblende (durch eine Achse vom Beobachter aus betätigt), Kameraobjektiv, Kassettenhalter.

aber auch Modifikationen der Toeplerschen Schlierenmethode benutzt werden, deren Ergebnis allerdings nicht so sicher ist. Die optische Anordnung der Schlierenmethode ist in Abb. 6 dargestellt.

Das Licht, das durch das U-Rohr hindurchtritt, wird in den optisch inhomogenen Grenzflächen zwischen der Proteinlösung und der Pufferlösung nach unten abgelenkt und durch die vor dem Kameraobjektiv angebrachte Schlierenblende ausgeblendet. Hierdurch scheint der inhomogene Bezirk auf der Mattscheibe der Kamera als dunkle Bande. In den beiden Schenkeln des U-Rohrs treten die Komponenten in der umgekehrten Reihenfolge ihrer Wanderungsgeschwindigkeiten auf. Man erhält also ein doppeltes „Bandenspektrum“. Hierdurch ist eine wertvolle Möglichkeit zur Kontrolle gegeben. Nur solche Banden dürfen als real angesehen werden, die auf beiden Seiten mit der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit auftreten. Die Möglichkeit des Auftretens „falscher Banden“ muß stets berücksichtigt werden. Diese können vorgetäuscht werden durch Konvektionen oder durch Grenzzoneanomalien, die besonders in konzentrierten Pufferlösungen zu erwarten sind. So hat sich z. B. die dem δ -Globulin des Serums zugesprochene Bande als Täuschung erwiesen.

Die Empfindlichkeit der optischen Methode ist beträchtlich. Bei der mittleren Ausführung des Tiselius-Apparates können Proteine noch in einer Konzentration von etwa 0,05% nachgewiesen werden.

⁴¹) A. Tiselius, Trans. Faraday Soc. 33, 524 [1937].

⁴²) Die Apparate werden von der Firma Hellige u. Co. in Freiburg i. Br. hergestellt.

Ausführung der Trennung im Tiselius-Apparat.

Das U-Rohr besteht aus verschiedenen seitlich gegeneinander verschiebbaren Teilen (Abb. 7). Die Verschiebung kann erschütterungsfrei durch seitliche Stempel vorgenommen werden, die durch Druckluft betätigt werden. Die untere Kammer wird mit der Proteinlösung gefüllt und diese dann durch seitliche Verschiebung von den übrigen Teilen des U-Rohrs abgetrennt. Dann werden die oberen Teile des U-Rohrs und die Elektrodengefäße mit der gleichen Pufferlösung, in der das Protein gelöst wurde, gefüllt. Der Unterschied der Leitfähigkeit zwischen Puffer und Lösung soll möglichst gering sein. Deshalb werden die Proteinlösungen sorgfältig gegen die verwendete Pufferlösung dialysiert. Nachdem der Apparat die Temperatur des Thermostaten angenommen hat, wird die untere Kammer wieder zurückgeschoben und auf diese Weise die Pufferlösung störungsfrei mit der Proteinlösung unterschichtet. Nach dem Anlegen der Spannung kann die Wanderung der einzelnen Protein-komponenten beobachtet werden. Um die präparative Trennung durchzuführen, wurde von Tiselius eine Kompensationsanordnung eingeführt. Durch ein Uhrwerk wird ein Ebonitzylinder langsam und mit konstanter Geschwindigkeit in das eine Elektrodengefäß hinabgelassen, wodurch eine Flüssigkeitsverschiebung in dem U-Rohr stattfindet, die entgegengesetzt wirkt wie die Wanderungsgeschwindigkeit. Durch geeignete Wahl des Zylinderdurchmessers und des Spannungsabfalls ist es möglich, die Proteine sozusagen auf der Stelle wandern zu lassen, so daß schließlich der in Abb. 3b dargestellte Endzustand erreicht wird. Durch seitliche Verschiebung der Kammern werden nun die reinen Komponenten von dem übrigen Teil der Lösung abgetrennt. Nach Entfernung der Elektrodengefäße und Verbindungsstücke werden die Kammern mit geeigneten Pipetten entleert. Hiernach wäre es also theoretisch möglich, auch Stoffe zu trennen, die nur einen sehr geringen Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Praktisch ist hier aber eine Grenze gesetzt, da bei sehr lang dauernden Versuchen die Banden durch die Diffusion sehr breit und unscharf werden, so daß der Trennungsvorgang nicht mehr mit Sicherheit verfolgt werden kann.

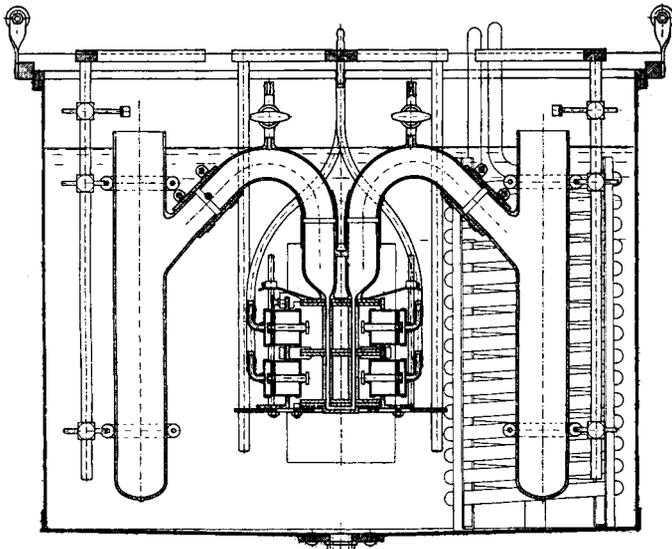


Abb. 7. Elektrophoreseapparat nach Tiselius im Kältethermostaten.

Die Elektroden sowie die äußere Isolierung sind nicht mitgezeichnet.

Spannung und Belastung.

Für elektrophoretische Messungen ist es notwendig, eine möglichst konstante Stromquelle zu benutzen. Für hohe Spannungen wird ein Gleichrichter verwendet, der einen guten Gleichstrom liefert. Zur Messung des Potentialgefälles im U-Rohr ist es zweckmäßig, den durchgehenden Strom zu messen. Der Spannungsabfall in V/cm beträgt dann

$$E = \frac{i}{q \cdot \lambda} \quad (II)$$

i = Stromstärke, q = Querschnitt des U-Rohres, λ = Leitfähigkeit der Lösung.

Bei hohen Spannungen muß besonders auf Dichtigkeit des Apparates geachtet werden, um Kriechströme zu vermeiden.

Die Belastung, die gerade noch zulässig ist, ohne daß Wärme-konvektionen auftreten, ließ sich durch Versuche mit Wechselstrom feststellen. Bei der mittleren Ausführung des Tiselius-Apparates beträgt die Höchstgrenze der Belastung $w = 0,5 - 1 \text{ W/cm}^3$. Für jeden Versuch läßt sich dann die gerade noch zulässige Spannung berechnen nach der Gleichung

$$E = \sqrt{w/\lambda} \quad (III)$$

Fehlerquellen⁴³⁾.

Um ein definiertes Potentialgefälle zu haben und um scharfe Grenzzonen zu bekommen, muß die Leitfähigkeit des gelösten Stoffes zu vernachlässigen sein gegenüber der Leitfähigkeit des Lösungsmittels. Tiselius hat gefunden, daß man Grenzanomalien, die sich in einer Verwischung der Banden äußern, bekommt, wenn die Verschiedenheit der Versuchslösung und des überschichteten Puffers im Leitvermögen größer als 1% und im p_H größer als 0,01 ist. Diese Bedingungen lassen sich leicht einhalten, wenn die Proteinkonzentration 1—2% nicht überschreitet. Bei zu geringer Proteinkonzentration kann allerdings die Grenzzone wegen des zu geringen Dichteunterschiedes instabil werden. Wenn möglich, soll bei einer Leitfähigkeit von $1-2 \cdot 10^{-3} \Omega^{-1}$ gearbeitet werden, da man erfahrungsgemäß hierbei die günstigsten Bedingungen hat.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der ungleichen Wanderungsgeschwindigkeit der Banden im anodischen und kathodischen Schenkel des U-Rohres, die durch die Flüssigkeitsverschiebung während der Elektrophorese hervorgerufen wird. Der Fehler läßt sich vermeiden, indem man die Flüssigkeitsoberfläche in den beiden Elektrodengefäßen (Abb. 7) durch Einsetzen passender Hartgummistopfen verkleinert.

Im folgenden soll an einigen Beispielen die Anwendung des Tiselius-Apparates bei der präparativen Fällung von Eiweißstoffen geschildert werden.

Die Trennung von Phycocyan und Phycoerythrin⁴¹⁾.

Diese beiden Proteine, welche gemeinsam in bestimmten Algen vorkommen, können auf chemischem Wege nur unvollkommen getrennt werden. Durch Umkristallisieren erhält man unter beträchtlichen Verlusten an Phycocyan nur ungefähr 10% des Phycoerythrins in reiner Form. Die elektrophoretische Trennung gestaltet sich dagegen in diesem Falle sehr einfach, da der Unterschied in der Beweglichkeit sehr beträchtlich ist. Er beträgt in alkalischer Lösung etwa $10 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V/s}$. Bei dem Trennungsversuch wurde eine Spannung von 880 V (23,2 V/cm im Rohr) bei einem Strom von 15,5 mA angewendet. Die Substanz wurde in $m/100$ Phosphatpuffer p_H 6,96, Leitfähigkeit $0,77 \cdot 10^{-3}$ bei 0° gelöst. Die Belastung betrug demnach $0,415 \text{ W/cm}^3$ und lag somit unterhalb des Maximums. Die Kompensation wurde so eingerichtet, daß beide Banden eine scheinbar gleiche Wanderungsgeschwindigkeit in entgegengesetzter Richtung erhielten. Nach 2 h und 20 min war die Trennung beendet, die Zellen an der einen Seite enthielten nur Phycocyan, die an der anderen Seite nur Phycoerythrin.

Trennung der Serumproteine⁴⁴⁾.

Tiselius stellte fest, daß sich elektrophoretisch vier verschiedene Proteine im normalen Serum unterscheiden lassen. Sie werden in der Reihenfolge ihrer Wanderungsgeschwindigkeit als Albumin und α -, β - und γ -Globulin bezeichnet (Abb. 8). Durch Ammonsulfatfällungen gelingt es nicht, ein einheitliches Protein aus dem Serum zu gewinnen. Die dargestellten Fraktionen sind Mischungen mit wechselnder Zusammensetzung. Die am leichtesten ausfällbaren Fraktionen enthalten hauptsächlich γ - und β - und nur kleine Mengen α -Globulin. Mit mehr als 55% Ammonsulfat-sättigung erhält man Produkte, die aus 75% Albumin und 25% Globulin bestehen. Ein dreimal umkristallisiertes Serumglobulin besteht immer noch aus 75—85% α -Globulin und etwas γ -Globulin. Das sog. Euglo-

Albumin.....

Globulin α ...Globulin β ...

Antikörper...

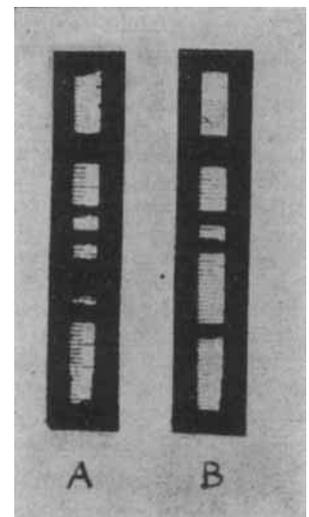
Globulin γ ...

Abb. 8. Wanderung der Proteine des Pferdeserums im elektrischen Feld.

A = Antipneumokokkenserum; B = Normalserum (nach Tiselius u. Kabat).

⁴³⁾ K. O. Pedersen, Kolloid-Z. 63, 268 [1933].⁴⁴⁾ A. Tiselius, Biochemic. J. 31, 1464 [1937].

bulin besteht hauptsächlich aus β - und γ -Globulinen und etwas α -Globulin. Das durch Elektrodialyse von Serum gewonnene Pseudoglobulin enthält 85% α - und 15% γ -Globulin, aber kein β -Globulin.

Durch Elektrophorese gelingt es, die vier Komponenten in reiner Form darzustellen. Allerdings ist die quantitative Trennung von so vielen Komponenten nicht ganz einfach. Bei der Trennung von mehr als zwei Komponenten wird grundsätzlich zunächst eine Gruppe der schnellsten und langsamsten Komponenten abgetrennt und diese dann für sich in weiteren Ansätzen verarbeitet. Allerdings muß man hierbei eine starke Verdünnung der isolierten Bestandteile in Kauf nehmen. Die einzelnen Trennungsvorgänge müssen mehrmals wiederholt werden, um zum Schluß genügend Material zur Verfügung zu haben.

Der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit der Serumproteine ist im alkalischen Gebiet am größten, die Fraktionierung wurde daher bei p_H 8,03 ausgeführt. Da die Leitfähigkeit des Serums beträchtlich ist und außerdem die Globuline in salzarmen Lösungen ausflocken, wurde ein ziemlich konzentrierter Puffer von der Ionenkonzentration 0,1 angewendet. Es wurde unverdünntes Serum benutzt, das gegen diese Pufferlösung dialysiert war. Das Potentialgefälle betrug 7,25 V/cm. Zur Reindarstellung des Serumalbumins, der am schnellsten wandernden Komponente, wurde die Kompensation so eingestellt, daß das α -Globulin eine scheinbare Wanderungsgeschwindigkeit 0 erhielt. Nach Beendigung des Versuches enthält dann die obere Kammer des anodischen Schenkels reines Albumin. Um größere Mengen Albumin neben reinem α -Globulin zu gewinnen, wurden in mehreren Ansätzen zuerst diese beiden schnelleren Komponenten von den beiden anderen Globulinen abgetrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und bei 400 V Spannung (9,2 V/cm) elektrophoretisch getrennt. Hierbei wurde die Kompensation so eingestellt, daß die beiden Banden scheinbar entgegengesetzt wandern. Dies kann durch zeitweiliges Abstellen des Uhrwerks der Kompensationseinrichtung und durch Regulierung der Spannung experimentell ohne Schwierigkeiten erreicht werden. Nach 24 h war die Globulinbande im Bodenstück des U-Rohres verschwunden, der positive Schenkel des U-Rohres enthielt reines Albumin und der negative Schenkel reines α -Globulin. Auf diese Weise wurden 8 cm³ einer 2 proz. Lösung von Serumalbumin und eine gleiche Menge einer 0,2proz. Lösung von α -Globulin erhalten. Zur Darstellung des α -Globulins kann auch eine Lösung von Pseudoglobulin benutzt werden,

die aus 85% α -Globulin und 15% γ -Globulin besteht. Eine vollständige Trennung dieser beiden Komponenten wurde in 5 h bei 400 V Spannung (9,7 V/cm) erzielt. Aus 12,5 cm³ Pseudoglobulinlösung wurden 8 cm³ einer 2,2proz. α -Globulinlösung und die gleiche Menge einer 0,3proz. Lösung von γ -Globulin erhalten. β -Globulin wurde in zwei Stufen gewonnen. Zuerst wurden die beiden langsameren Komponenten des Serums, das β - und γ -Globulin aus dem Serum isoliert und diese dann in einem zweiten Versuch voneinander getrennt.

Das Beispiel der Serumfraktionierung zeigt, daß sich auch sehr schwierige Trennungsprobleme mit dem *Tiselius*-Apparat durchführen lassen.

Die Elektrophorese eignet sich auch zur Untersuchung von Immuneren⁴⁵⁾.

Bei einigen Tieren (Pferd, Kuh und Schwein) tritt im Serum nach Immunisierung gegen spezifische Polysaccharide aus Pneumokokken eine neue Eiweißkomponente auf, deren Wanderungsgeschwindigkeit zwischen der von β - und γ -Globulin liegt (Abb. 8). Bei Kaninchen und Affen ist dagegen der Antikörper elektrophoretisch vom γ -Globulin nicht zu unterscheiden, dessen Konzentration in dem Immuneserum des Kaninchens von 17% auf 56% erhöht ist. Eine Reindarstellung des Antikörpers ist in diesem Falle elektrophoretisch nicht möglich, doch kann durch die Entfernung der übrigen Serumproteine eine bedeutende Anreicherung erzielt werden. Durch Elektrophorese gelang es, das durch Ammonsulfatfällung aus Pferdeserum gewonnene Diphtherieantitoxin weiter zu reinigen, so daß ein Protein erhalten wurde, das zu 43,5% mit Diphtherietoxin spezifisch fällbar war⁴⁶⁾.

Von weiteren Versuchen zur elektrophoretischen Trennung von Eiweißstoffen sei hier noch die präparative Darstellung eines kristallisierten Proteins aus Kulturen von Tuberkelbazillen erwähnt⁴⁷⁾.

Die Fortschritte in den analytischen Methoden und in den Darstellungsverfahren haben es ermöglicht, eine große Anzahl einheitlicher und gut charakterisierter Eiweißstoffe zu gewinnen. Es ist anzunehmen, daß die Zahl der rein dargestellten Eiweißstoffe in Zukunft noch beträchtlich vermehrt wird; damit ist eine wesentliche Voraussetzung geschaffen, um in die Struktur und das biologische Verhalten der Proteine tiefer einzudringen.

Eingeg. 1. Oktober 1940. [A. 97.]

⁴⁵⁾ A. Tiselius u. E. A. Kabat, Science [New York] **87**, 416 [1938].

⁴⁶⁾ A. M. Pappenheimer, H. P. Lundgren u. I. W. Williams, J. exp. Medicine **71**, 247 [1940].

⁴⁷⁾ F. B. Seibert, K. O. Pedersen u. A. Tiselius, ebenda **68**, 413 [1938].

Fortschritte der Landwirtschaftschemie 1931—1940

Von Dr. A. JACOB, Wissenschaftliche Abteilung des Deutschen Kalisyndikats, Berlin

Auf die Entwicklung der Landwirtschaftschemie war in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrzehnts von großem Einfluß die einheitliche Ausrichtung der deutschen Forschung durch die Reichsarbeitsgemeinschaft der Landwirtschaftswissenschaft, die Gemeinschaftsarbeiten verschiedener Institute in die Wege leitete, um Fragen von besonders vordringlicher praktischer Bedeutung möglichst rasch einer Lösung entgegenzuführen. Das Bestreben, die Landwirtschaftschemie in den unmittelbaren Dienst der Praxis zu stellen, hat aber keineswegs zur Folge gehabt, daß die Bearbeitung rein wissenschaftlicher Fragen vernachlässigt wurde. Es bestätigte sich im Gegenteil, daß eine Förderung der Praxis in der Regel eine vorherige genaue Aufklärung von Problemen zur Voraussetzung hat, denen man auf den ersten Blick nur eine rein wissenschaftliche Bedeutung zuzuschreiben geneigt ist, wie z. B. Verbesserungen der Analysenmethoden oder Aufklärung grundlegender Reaktionen.

I. Bodenkunde.

1. Bodenbildung und Bodeneinteilung.

Nach wie vor stand das Studium der Dynamik der Bodenbildung an Hand der Bodenprofile im Vordergrund, insbesondere im Hinblick auf die Verbesserung der Böden auf lange Sicht sowie auf die Gewinnung von Neuland für Kulturzwecke. Von *Hissink*¹⁾ wurde die Veränderung der Zuiderseeböden nach dem Eindeichen untersucht. *Blanck*²⁾ wies auf die Rolle

der aus dem Rohhumus entstehenden Schwefelsäure bei der Verwitterung hin, die das Eisen der Silicate in Lösung bringt.

Bei der Einteilung der Böden ist man von der einseitigen Überschätzung der klimatischen Faktoren, die auf Grund der Erfolge der russischen Bodenkunde nahe lag, zurückgekommen und betont die Bedeutung des Muttergesteins als Faktor der Bodenbildung und als Kriterium für die Bodenklassifikation. Als wertvolles Hilfsmittel bei der Klassifikation der großen Bodengruppen der Welt hat sich die Catenaeinteilung von *Milne*³⁾ erwiesen, die Gruppen von Böden zusammenfaßt, die, aus ähnlichem Muttergestein entstanden, durch topographische Bedingungen zu verschiedenen Böden geworden sind, aber stets in Verbindung miteinander gefunden werden. Für eine Einteilung der Böden der Welt auf genetischer Grundlage sind verschiedene Vorschläge gemacht worden. Beachtlich ist ein Vorschlag von *del Villar*⁴⁾, der vier Bodengruppen vorsieht, nämlich die Salz-Alkali-Gruppe, die kalkhaltige Gruppe, die sesquioxydische Gruppe (Allite, Siallite und sauer-humose Böden) und die hypopedische Gruppe (Alluvial- und Gleyböden). Jede dieser Gruppen wird jeweils in die Stufen unreif, reif und überreif unterteilt. *G. W. Robinson*⁵⁾ vertritt allerdings den Standpunkt, daß unsere Kenntnis der verschiedenen Bodenarten der Welt noch nicht umfassend genug ist, um jetzt bereits den Versuch einer die ganze Welt umfassenden Klassifikation der Böden zu unternehmen.

¹⁾ G. Milne, Bodenkundl. Forsch. [Beih. zu: Mitt. int. bodenkundl. Ges.] **14**, 183 [1935].

²⁾ H. del Villar: Los Suelos de la Peninsula Luso-Iberica, Madrid 1937.

³⁾ G. W. Robinson: Die Böden, Berlin 1939, S. 412.