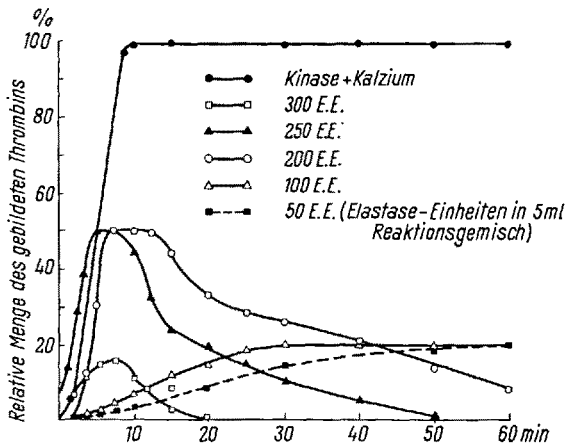


wir das kristallinische, dialysierte und lyophilisierte Trypsinpräparat einer dänischen Firma¹⁴ angewandt.



Die Gerinnungszeit wurde bei Zimmertemperatur auf Grund des Auftretens von Fibrinfäden auf Tüpfelplatten mit Stoppuhren gemessen.

Wir haben bei den Vorversuchen beobachtet, dass die Elastase ähnlich dem Trypsin die Rekalkifikationszeit verschiedener Blutplasmen in beträchtlichem Masse zu verkürzen fähig ist. In folgenden Versuchen haben wir festgestellt, dass das Enzym seinen gerinnungsfördernden Einfluss auf Blutplasma unter bestimmten Konzentrationsgrenzen auch in Abwesenheit von Kalzium besitzt.

Man bekommt die kürzesten Gerinnungszeiten oder die relativ höchsten Thrombinaktivitäten bei einer Elastasekonzentration von 30–35 E. E. je ml Blutplasma. Dagegen ist die Elastase nicht fähig das Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln und hat keinen Einfluss auf die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung, ausserdem löst sie das Reaktionsprodukt auf. Das Enzym lässt das Fibrinogen bei niedrigen Konzentrationen unverändert und zerstört es sofort bei den für die Plasmagerinnung optimalen Konzentrationen. Fibrinogen bildet sich auch bei Zugabe von Thrombin nicht mehr.

Die Elastase wirkt auf den Blutgerinnungsprozess durch Aktivierung des Prothrombins. Gibt man verschiedene Mengen von Elastase bei Zimmertemperatur zu einer rohen Prothrombinlösung und untersucht die gerinnungsfördernde Wirkung der aus dem Reaktionsgemisch ausgenommenen Proben an gereinigtem Fibrinogen, so kann man Folgendes beobachten: Bei niedrigen Elastasekonzentrationen gibt es keine Thrombinbildung. Bei einem Enzymüberschuss bildet sich auch kein Thrombin, weil Prothrombin, wie auch Thrombin, durch Elastase sehr rasch abgebaut werden. In relativ engen Grenzen verursacht eine kleine Steigerung der Enzymkonzentration die unverhältnismässig grosse Zunahme der entstehenden Thrombinmenge. Eine beträchtliche Thrombinmenge bildet sich bei diesen Elastasekonzentrationen sehr schnell. Die Geschwindigkeit der Thrombinbildung durch Elastase (Abb.) entspricht der physiologischen, mit Kinase und Kalzium erzielten Aktivierung, die als Kontrolle durchgeführt wurde. Das durch Elastase erzeugte Thrombin beträgt die Hälfte der mit Kinase und Kalzium gewonnenen Thrombinmenge. Die optimalen Enzymkonzentrationen entsprechen etwa 40–50 E.E. je ml des Reaktionsgemisches bzw. je 25 mg Eiweiss im Prothrombin. Man

muss nämlich darauf hinweisen, dass die Optimalkonzentration von Elastase entscheidend durch die Eiweisskonzentration der Prothrombinlösung bestimmt wird. Bei einem höheren Eiweissgehalt steigt auch die Optimalkonzentration. Bei niedrigeren Enzymkonzentrationen, zum Beispiel 10–20 E.E. je 25 mg Protein, bildet sich zwar durch Elastase gleich viel Thrombin wie aus Prothrombin durch Thrombokinase, die Bildungsgeschwindigkeit ist aber sehr niedrig und die Menge des Thrombins sehr gering. Bei höheren Enzymkonzentrationen dagegen, zum Beispiel 60–70 E.E. je 25 mg Eiweiss, steht der proteolytische Abbau durch Elastase der Thrombinbildung nicht nach und so geht das gebildete Thrombin sehr rasch zugrunde. Zwischen den Mengen des Prothrombins, der Elastase und des gebildeten Thrombins besteht eine lineare Beziehung in der Prothrombin-Elastase-Reaktion. Verwendet man grössere Mengen von Prothrombin, so bildet sich mehr Thrombin und die Reaktion verbraucht mehr Elastase zur Umwandlung.

Die Reaktion zwischen Prothrombin und Elastase ist unabhängig von der Gegenwart von Thrombokinase und Kalziumionen. Einerseits kann die Elastase das Prothrombin in filtriertem Plasma leicht in Thrombin umwandeln. Andererseits gibt man ins Reaktionsgemisch bei Optimalkonzentration der Elastase verschiedene Mengen Thrombokinase bzw. Kalzium, so hat Elastase keinen Einfluss weder auf die Bildungsgeschwindigkeit noch auf die Menge des entstehenden Thrombins.

Die sich zwischen Prothrombin und Elastase abspielende Reaktion hat kein gut definiertes optimales pH. Je höher die Enzymkonzentration ist, desto mehr verschiebt sich das optimale pH gegen die saure Seite. Das kann dadurch erklärt werden, dass der Abbau des Thrombins bei höheren Enzymkonzentration sowie auch bei alkalischer Reaktion schneller ist.

Die ausführliche Veröffentlichung soll in der Zeitschrift *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* erscheinen.

D. BAGDY

Biochemische Abteilung des Forschungsinstituts für pharmazeutische Industrie, Budapest (Ungarn), 6. November 1958.

Summary

Purified elastase prepared by adsorption on synthetic zeolite in proper concentrations causes the coagulation of blood. Elastase was found to have no direct coagulative action on purified fibrinogen. Its coagulating action is due to the fact that it reacts with prothrombin to form thrombin. The reaction between prothrombin and elastase is independent of the presence of either platelets, thromboplastin or Ca-ions.

PRO EXPERIMENTIS

A Simple Method for the Assay of Carbohydrases

Chemical methods for the assay of carbohydrases in general are mainly based on the increase in the reducing value of the substrates on incubation of the reaction mixtures with the enzyme under consideration and can

¹⁴ Novo Industri A/S.

be conveniently employed in the sugar determination method of SOMOGYI¹ or other well-known methods.

In case of reaction mixtures which contain reducing bodies other than sugars, the interfering material can be removed by zinc sulphate² or other suitable salts.

When large quantities of substances with high reducing values are present in such systems, the assay of the enzymes under investigation presents a special problem.

While studying the carbohydrase activities of some mucilaginous plants, it was found that the dialysed water extracts themselves had high reducing values, and even after precipitation of the enzymes with alcohol, the supernatants had considerable reducing values, which appreciably interfered with carbohydrase activity determinations. A paper chromatographic method was therefore standardized in this laboratory which was found to be very convenient and simple.

Method: The reaction mixture consisted of the following:

- 1.0 cm³ 10.0% maltose (carbohydrate) solution;
- 1.0 cm³ buffer solution of appropriate pH;
- 2.0 cm³ dialyzed enzyme preparation.

Total 4.0 cm³.

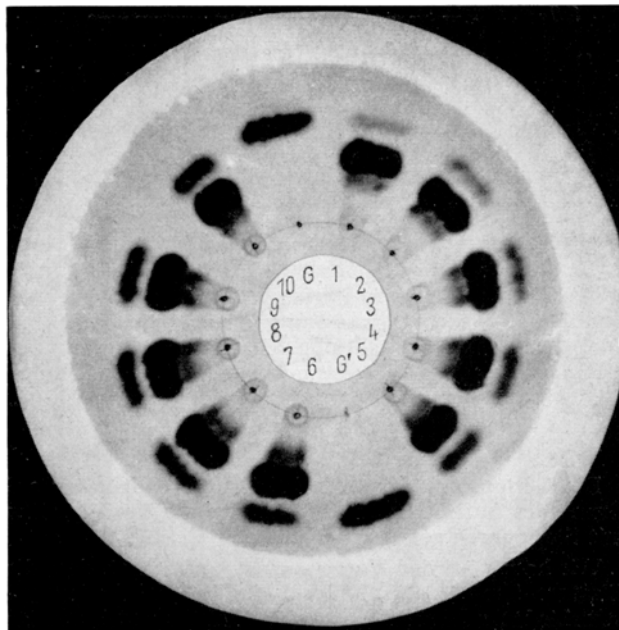
A few drops of toluene served as preservative.

The reaction mixture was incubated at 37°C for 24 h. After this time, 10 μ l of the reaction mixtures were applied to different points taken on the circumference of a circle (3.0 cm diameter) drawn at the centre of a Whatman filter paper disc (18 cm diameter). Standard sugar solutions were applied on the same disc. The disc was twice irrigated with butanol: acetone: water = 20:70:10 and glucose which had distinctly separated from maltose was estimated by the method described by GIRI and NIGAM³ using triphenyl tetrazolium chloride as chromogenic reagent. The Figure gives the chromatogram obtained by following this procedure.

The acetone in the irrigating solvent stops the reaction. If the reaction is rapid, it may be stopped by addition of an equal volume of warm ethanol and by examining the supernatants by the procedure described above. Suitable controls must be included for correct interpretation of results.

The method is most convenient when the products of the reaction have very different R_f values to the substrates. Thus when maltose, maltose triose, dextrin, starch, glycogen etc. are used as substrates, the method can be ap-

plied without much modification. In the case of raffinose, melibiose may be estimated in order to get the measure of the enzyme activity. In case of sucrose and lactose,



The circular paper chromatogram obtained after the separation of glucose from maltose in the reaction mixtures.

Developing solvent: Butanol:acetone:water = 20:70:10.
Spray reagent: triphenyl tetrazolium chloride.

where the products of reaction have R_f values very similar to those of the solvent described in the present communication, some other suitable solvent with a higher resolving power for fructose and glucose and galactose may be employed. The method gives reasonably accurate results when quick determinations are necessary.

The work was carried out at Wilson College, Bombay, under the guidance of Dr. J. W. AIRAN, to whom the author is grateful.

R. W. P. MASTER*

* Present address: *Haffkine Institute, Parel, Bombay (India), November 18, 1958.*

Résumé

Description d'une méthode chromatographique simple pour déterminer les carbohydrases en utilisant un morceau de papier circulaire.

¹ M. SOMOGYI, *J. biol. Chem.* **195**, 19 (1952).

² M. SOMOGYI, *J. biol. Chem.* **160**, 69 (1945).

³ K. V. GIRI and V. N. NIGAM, *J. Ind. Inst. Sci.* **36**, 49 (1954).