

der HPF während 3 min auf 56°C. Die zweite Linie, welche stets bei den Diffusionsversuchen mit HPF vorhanden war und welche nach Sättigung des Antiserums mit γ -Globulin verschwand, war mit der Linie des zu Vergleichszwecken zugesetzten γ -Globulins identisch. Beim Vergleich der einzelnen HPF in Kreuzversuchen konnten wir keine besondere abweichende Komponente nachweisen (Abb. 3). Das Anti-HPF-Serum übte keinen Einfluss auf die Konversion des plasmatischen Prothrombins aus. Nach seinem Zusatz zur gelösten HPF und in Anwesenheit des Thrombins trat eine faserige Masse in Erscheinung, die sich unter gleichen Bedingungen von dem gelatinösen Präzipitat bei Benutzung der Cohnschen Fraktion I unterschied.

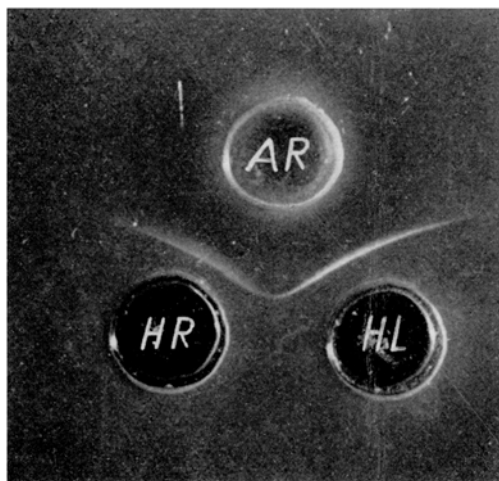


Abb. 3: HR-HPF eines Kranken mit maligner Retikulose
HL-HPF eines Kranken mit Lymphogranulomatose
AR-Anti-HPF-Serum

Diskussion: Die gewonnenen plasmatischen Kryopräzipitate waren alle bei 37°C in 0,15 M NaCl gut lösbar. Sie waren alle teilweise mit Thrombin gerinnbar. Der ungerinnbare Anteil konnte durch intensive Waschung nicht mehr weiter herabgesetzt werden. Die nach Zugabe von Thrombin und Ca⁺⁺ gewonnenen Polymeren zeigten einen bestimmten gegenseitigen Unterschied ihrer Lösungsfähigkeit in verdünnter Schwefelsäure und 30%igem Harnstoff¹³. Die bereits früher erwähnten Eigenschaften (ähnliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten wie das Fibrinogen, teilweise Gerinnbarkeit mit Thrombin), ferner der Umstand, dass das HPF nach Abkühlung von Heparinplasma und nicht nach Abkühlung des Serums mit oder ohne Heparinzusatz entsteht, weisen auf die Verwandtschaft mit Fibrinogen hin. Die durch Immunisation der Kaninchen mit plasmatischen Kryopräzipitaten gewonnenen Antiseren gaben Präzipitationslinien sowohl mit der HPF als auch mit dem Fibrinogen der Cohnschen Fraktion I. Eine der Präzipitationslinien war bei Verwendung der Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY mit der Linie des gereinigten Fibrinogens der Cohnschen Fraktion I identisch. Sie trat jedoch nach Erhitzen des Antigens (HPF) (3 min auf 56°C), nach Fällung der HPF mit Thrombin und auch nach Absättigung des Antiserums mit dem Fibrinogen nicht mehr in Erscheinung. Daraus wird geschlossen, dass die HPF eine mit dem Fibrinogen immunologisch identische Komponente neben einer γ -Globulin-Komponente, deren Präzipitationslinie nach völliger Absättigung des Antiserums

mit γ -Globulin verschwand, enthält. In den Kreuzversuchen mit Anti-HPF-Seren und homologen und heterologen HPF ist in keinem Fall das Entstehen einer atypischen Präzipitationslinie, deren Gegenwart auf die individuelle Spezifität der HPF und dadurch auf den Paraproteincharakter der HPF im strengen Sinne des Wortes hinweisen würde, beobachtet worden. Dies wird auch durch den Umstand bekräftigt, dass bei den elektrophoretischen Untersuchungen der Seren der untersuchten Patienten keine einem Paraprotein ähnliche Komponente aufgefunden werden konnte.

K. BARTA und A. BARTOVA

I. Medizinische Klinik der Palacky Universität, Olomouc (Tschechoslowakei), 17. August 1959.

Summary

The plasmatic fraction, which is precipitated by cooling human heparin plasma, has been found to contain the constituent identical with γ -globulin and also another component with the fibrinogen of Cohns' fraction I immunologically identical. With the help of the agar-gelose diffusion method, no qualitative immunological differences have been found with regard to the antigenous composition of the plasmatic fraction isolated in cases of various system diseases.

¹³ K. BARTA, Acta univ. Palack (im Druck).

Studies on Biosynthesis of Sucrose

The authors have already reported¹ the presence of sucrose phosphorylase in sugar cane juice. The sucrose phosphorylase isolated by the authors is similar to that isolated by HASSID and DOUDOROFF² only in so far as it is not inhibited by NaF. It has not been reported as yet how the sucrose phosphorylase from the cane juice differs from the enzymes reported earlier in *Pseudomonas saccharophila*², wheat germ extract^{3,4}, and pea extract⁵. In this communication, a study of the kinetics of the enzyme has been incorporated to indicate that the sucrose phosphorylase isolated from cane juice differs markedly from the enzyme reported earlier.

It has been found that the enzyme is stable towards dialysis against citrate, veronal acetate and phosphate buffers at pH 6.6 and 5°C. Dialysis towards distilled or tap water up to 72 h at 5°C did not reduce the enzyme activity to any appreciable extent. This is in contrast to the enzyme from *Pseudomonas*² and pea extract⁵.

Repeated precipitation with ammonium sulphate and dialysis against tap or distilled water did not injure the enzyme activity, proving thereby that no other coenzyme is associated with sucrose phosphorylase to carry out the sucrose synthesis reaction in the sugarcane plant. No

¹ J. P. SHUKLA and K. A. PRABHU, Naturwissenschaften, in press.

² M. DOUDOROFF, N. KAPLAN, and W. Z. HASSID, J. biol. Chem. 148, 67 (1943).

³ L. F. LELOIR and C. E. CARDINI, J. Amer. chem. Soc. 75, 6084 (1953).

⁴ L. F. LELOIR and C. E. CARDINI, J. biol. Chem. 214, 149 (1955).

⁵ J. F. TURNER, Nature 172, 1149 (1953).

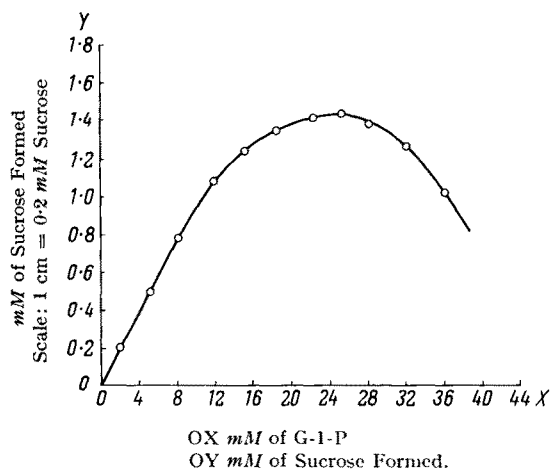


Fig. 1

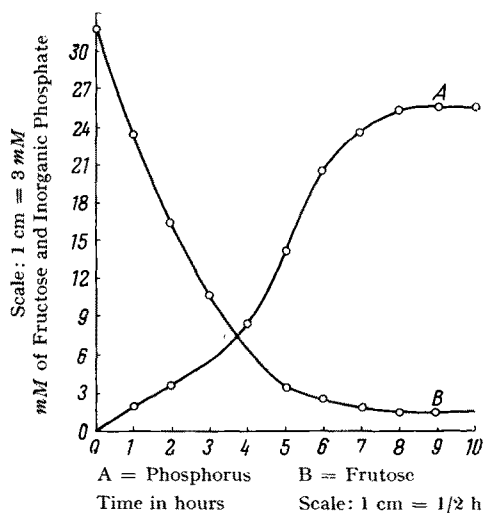


Fig. 2

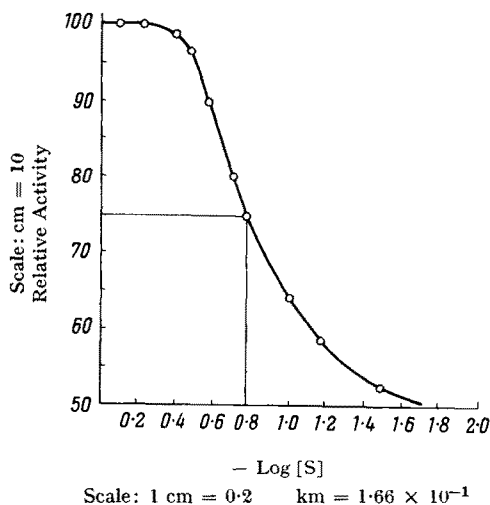


Fig. 3

priming agent is needed for the enzyme and it is destroyed by heating to 50°C for 10–15 min. The enzyme is stable at 5°C and can be preserved at this temperature for sixty days. The optimum for enzyme action lies at 6.6 pH. The temperature factor Q_{10} is nearly 2, and the rate of esterification is proportional to the amount of the enzyme preparation.

In the enzyme reaction $\text{G-1-P} + \text{Fructose} \rightleftharpoons \text{sucrose} + \text{inorganic phosphate}$, increasing the G-1-P concentration and keeping fructose concentration at 4.3 mM, the sucrose formation was increased; whilst on increasing the fructose concentration, no optimum was observed. Figure 1 shows the optimum for G-1-P Conc. to be 25.2 mM. Liberation of phosphorus from G-1-P takes place only after addition of fructose.

Equilibrium constant was determined by incubating a potent enzyme preparation with G-1-P + fructose at 6.6 pH and 35°C until there was no further change in phosphorus and sugar. The reaction was followed as shown in Figure 2 by the estimation of rise in inorganic phosphorus liberated and fall in reducing sugar, according to FISKE and SUBBAROW⁶, and SOMOGYI⁷ respectively. Time taken was 6–8 h.

Equilibrium constant $K_e = 5.6$ at 35°C and 6.6 pH.

Free energy $F_0 = -1053$.

The activity of the enzyme increases with an increase in sucrose concentration (esterification). The Michaelis constant was determined by plotting $-\log M_{\text{suc}}$ against relative activity of the enzyme. A «S» shaped curve is obtained as shown in Figure 3.

Michaelis constant $K_m = 1.66 \times 10^{-1}$.

The main differences in the sucrose phosphorylase from cane juice as against others lie in its behaviour towards dialysis against water⁵, in its equilibrium constant, which in this case is 5.6 as against 0.058 in *Pseudomonas saccharophila*², in the Michaelis constant, which is 1.66×10^{-1} as against 2.3×10^{-3} in wheat germ enzyme⁴, and in the optimum for G-1-P which is 25.2 mM as against 30.0 mM as observed in pea extract⁸.

The authors' thanks are due to Shri S. N. GUNDU RAO, B. Sc., A. H. B. T. I., F. R. I. C., Director, National Sugar Institute for taking keen interest in the work.

J. P. SHUKLA and K. A. PRABHU

National Sugar Institute, Kanpur (India), May 25, 1959.

Résumé

Du jus de canne à sucre, les auteurs ont extrait un enzyme, le sucrose phosphorylase, qui diffère des enzymes tirés jusqu'ici de *Pseudomonas saccharophila* par certaines propriétés caractéristiques. La présente note étudie ces propriétés et donne la détermination de leurs constantes physiques.

⁶ C. H. FISKE and Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

⁷ M. SOMOGYI, J. biol. Chem. 160, 61 (1945).

⁸ J. F. TURNER, Biochem. J. 67, 450 (1957).