

FINSKA SUOMEN  
KEMISTSAMFUNDETS KEMISTISEURAN  
MEDDELANDEN TIEDONANTOJA

REDAKTÖR – TOIMITTAJA  
Gösta Brunow



INNEHÅLL – SISÄLTÖ

Terje Enkvist: Ernst Qvist och Edvard Hjelt, glimtar av två av samfundets stiftare .....	56
H. B. Wiik: Om månstenarnas kemiska sammansättning .....	68
Johan Björksten, Elliott R. Weyer and Stephen M. Ashman: Study of Low Molecular Weight Proteolytic Enzymes	70

# SÄÄSTÄKÄÄ käyttämällä EPPENDORF- mikrolitrajärjestelmää

tarvitsette vähemmän näytettä, reagensseja ja aikaa

Eppendorf-mikrolitrajärjestelmä sopii pienille ja keskisuurille laboratorioille.

Täydennettynä Eppendorf-fotometrillä järjestelmä merkitsee tehokasta rationalisointia, ja laitteistolla voidaan suorittaa runsaasti erilaisia määrittäyksiä.

Eppendorf-järjestelmä vaatii useimmissa tapauksissa näytettä vain 10–15 mikrolitraa.

Mukana ohjekirja, jossa valmiit menetelmät yli 30 määrittäystä varten.

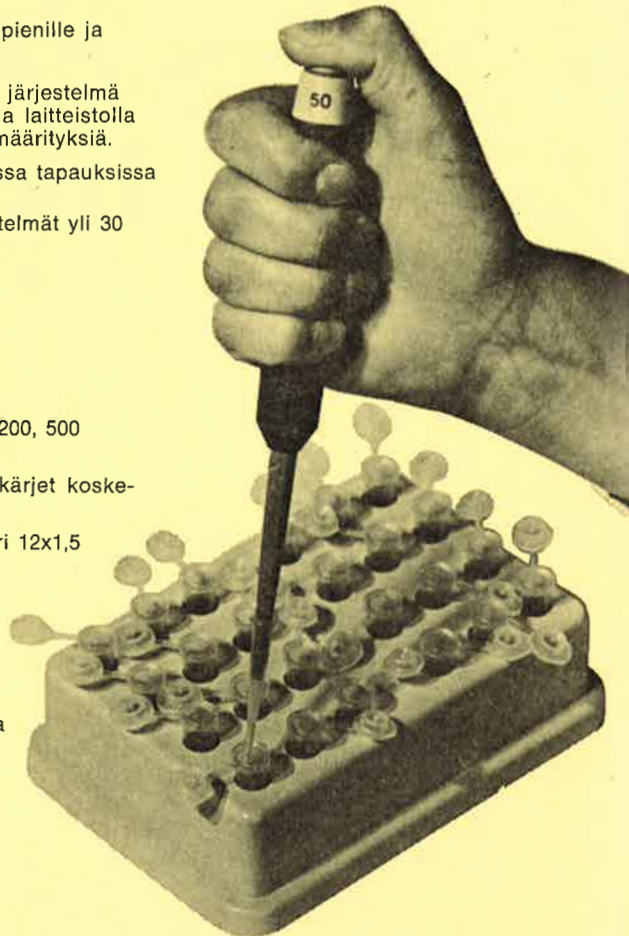
## EPPENDORF- mikrolitrajärjestelmän pääosat

- mikrolitrapipetit 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ja 1000 mikrolitraa
- kertakäyttöiset pipetinkärjet (vain kärjet kosketuksissa aineen kanssa)
- sentrifugi 15,000 kierr./min., roottori 12x1,5 ml, katkaisukello
- kertakäyttöiset kannelliset sentrifugiputket 1,5 ml
- ravistelulaite 24 putkelle
- termostaatti (Thermoblock)

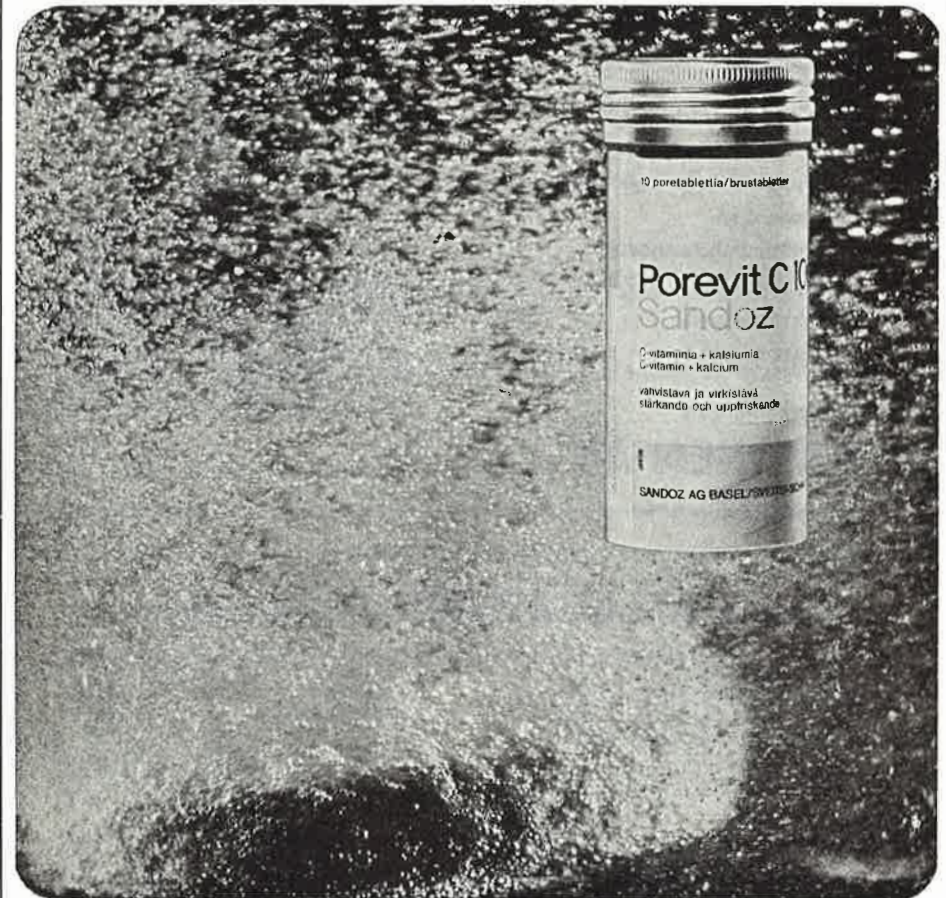
Suuria kliinis-kemiallisia laboratorioita varten Eppendorf-analyysiautomaatiikkaa

## LÄÄKETUKKU OY

Laboratorio-osasto  
Vattuniemenkuja 1 Helsinki 10  
Puh. 673 191, telex 121374



Vid ökat behov av  
C-vitamin och kalcium...



## Porevit C 1000<sup>®</sup>

Förpackningar: 10, 3 x 10 och 10 x 10 brustabletter

Smakvarianter: apelsin och citron

Receptfritt på alla apotek



S A N D O Z Hallonnäsgatan 8, Helsingfors 21



**B. Braun Melsungen**  
Apparatebau

## Thermomix II

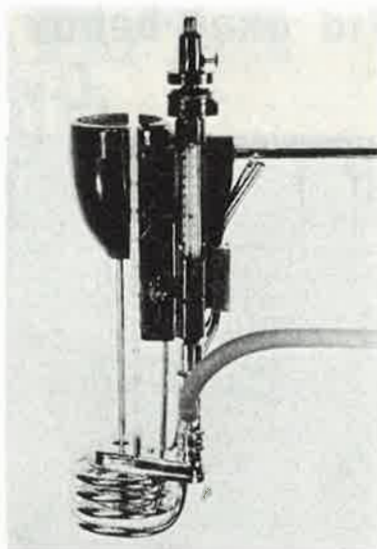
är redan ett begrepp

men B. Braun gör även en stor mängd andra termostater såsom

- dopptermostat med olika effekt
- vattenbad
- cirkulationstermostat
- kyltermostat
- skaktermostat
- värmeblock

Närmare uppgifter ger:

**A. ILMONEN Ab** Mikaelsgatan 19, 00100 Helsingfors 10, tel. 14 577



## Finska Kemistsamfundets Meddelanden

Annonspris		Prenumerationspris	
på annonssidor, 1/1 sida	150:—	i Finland	15:—
på annonssidor, 1/2 sida	80:—	till utlandet	18:—
på bakpärmen, hela sidan	200:—		

### Annons- och prenumerationsärenden

*Fil. mag. Björn Holm*  
Kaserngatan 16. A. 10, Helsingfors 13  
Telefon 46 04 11/259

## Suomen Kemistiseuran Tiedonantoja

Ilmoitushinnat		Tilaushintat	
ilmoitussivuilla, 1/1 sivu	150:—	Suomessa	15:—
ilmoitussivuilla, 1/2 sivu	80:—	Ulkomailla	18:—
takakannessa, koko sivu	200:—		

### Ilmoitus- ja tilausasiat

*Fil. maist. Björn Holm*  
Kasarmikatu 16. A. 10, Helsinki 13  
Puhelin 46 04 11/259

FINSKA  
KEMISTSAMFUNDETS  
MEDDELANDEN

SUOMEN  
KEMISTISEURAN  
TIEDONANTOJA

80 årg.

1971 N:o 4

80 vuosik.

Utgiven av — Julkaisija — Publisher  
Finska Kemistsamfundet — Suomen Kemistiseura — Chemical Society of Finland  
Postbox 10476 Postilokero  
Helsingfors — Helsinki

Styrelse — Hallitus  
LARS ANDERSEN — HOLGER SJÖBERG — LARS-OLOF THODÉN — GÖSTA BRUNOW —  
ELSA EHRNROOTH — TOR-MAGNUS ENARI — VERONICA SUNDMAN — KARIN SANDELIN  
NILS-ERIK ELLFOLK

Sekreterare — Sihteeri  
LARS-OLOF THODÉN Valhallagatan 3 Valhallankatu, Helsingfors 25 Helsinki, tel. 46 04 11 puh.

Kassör — Rahastonhoitaja  
BJÖRN HOLM, Kaserng. 16 A 10 Kasarmink. Helsingfors 13 Helsinki, tel. 46 04 11, 63 96 70 puh.

Arkivarie — Arkistonhoitaja  
ANJA ANDERSEN, N. Hesperlag. 7 A P. Hesperlank. Helsingfors 26 Helsinki, tel. 49 08 78 puh.

Redaktör — Toimittaja  
GÖSTA BRUNOW, Universitetets Kemiska Institut, S. Hesperlagatan 4 Helsingfors 10 Yliopiston  
Kemian Laitos, Et. Hesperlankatu 4 Helsinki 10 tel. 44 01 37 puh.

### CONTENTS

Terje Enkvist: Ernst Qvist och Edvard Hjelt, glimtar av två av samfundets stiftare .....	56
H. B. Wiik: Om månstenarnas kemiska sammansättning .....	68
Johan Björkstén, Elliott R. Weyer and Stephen M. Ashman: Study of Low Molecular Weight Proteolytic Enzymes	70

## Ernst Qvist och Edvard Hjelt, glimtar av två av samfundets stiftare

Föredrag vid Finska Kemistsamfundets 80-års-jubileum 13. 12. 1971

Av Terje Enkvist

I Finska Kemistsamfundets 50-års historik läser vi bl.a. följande:

»I augusti 1891 återvände den 31-årige docenten i kemi Ossian Aschan från en givande ettårig studieresa till Tyskland, . . . och sammanträffade med sin forna lärare, direktorn för Polytekniska institutet, kanslirådet *Ernst Qvist* . . . Han måste tala högt, ty Qvist var lomhörd och känd för att kunna slå dövörat till då någon kom med otrevliga invektiv i lärarkollegiet. När han ville det kunde han nog höra rätt bra och det ville han nu. Aschan berättade om Baeyer och indigo, om den nya kemiska industrin i Tyskland. Det var . . . klart att det snart i alla länder skulle bli omöjligt att bedriva kemisk industri utan kemisk-teknisk forskning i vetenskapens tecken . . . Kemisterna hos oss måste samlas och väckas . . . I Finland skulle grundas Finska Kemistsamfundet. Det var Qvist som framlade förslaget . . . och inbjöd Aschan och kemiprofessorn vid universitetet Edvard Hjelt, då 36 år gammal, hem till sig för att göra upp planer. . . Diskussionen fortsatte in på småtimmarna . . .» Den 3 oktober 1891 hölls sedan det konstituerande mötet på Kleinehs hotell, där utom de tre initiativtagarna sågs 6 andra, mestadels alldeles unga kemister, bland dem Gust. Komppa.

Av de tre initiativtagarna är väl Aschan den enda, som upplevts av flere av samfundets nuvarande medlemmar. Jag skall nu försöka ge glimtar av de två andra.

### *Qvist och polytekniska institutet*

Initiativet till det polytekniska institutet togs tidigt. Under franska revolutionen grundades 1795 den berömda *École Polytechnique* i Paris. Redan under den svenska tiden (1802) föreslog den kända kemiprofessorn vid Åbo Akademi Johan Gadolin inrättande av tekniska skolor på industriorter i Finland och ett seminarium med en professor och två assistenter för utbildning av lärare för dessa skolor. I utlandet inrättades polytekniska institut bl.a. i Prag 1806, i Stockholm 1825, i Köpenhamn 1829 och i St Petersburg 1828. Redan 1835 utträdades i Finland en förordning som innebar ett principbeslut att inrätta ett teknologiskt institut i Helsingfors. Men motståndet var hårt i det av



Edvard Hjelt, ca 1895.



Ernst Qvist, direktor för polytekniska institutet.

byråkrati, Hegels filosofi och språkgräl drabbade Finland. När ett konkret förslag framlades följande år förkastades alltsammans och man beslöt i stället inrätta tekniska söndagsskolor för hantverkare! Därtill kom två statsstipendier per år för teknisk utbildning utomlands. År 1847 upprättades äntligen tekniska realskolor i Helsingfors, Åbo och Vasa, men deras nivå var låg. År 1857 föreslogs i samband med den allmänna reformivern under Alexander II på nytt ett polytekniskt institut i Helsingfors, men förslaget motarbetades intensivt även av dem som bort veta bättre. Självaste J. V. Snellman skrev, att en mekaniker räcker till för att ställa upp alla de ångmaskiner den finska industrin behöver! Beträffande arkitekter var han dubbelt så frikostig, ty han medgav att det behövdes två! Därmed lyckades det att uppskjuta förverkligandet av ett polytekniskt institut för ytterligare ca 20 år framåt. År 1872 upphöjdes visserligen den tekniska realskolan i Helsingfors till »polyteknisk skola», men först år 1879 omvandlades den till ett verkligt polytekniskt institut.

Ernst Qvist föddes i Fredrikshamn 1839. Sedan han avlagt studentexamen 1857 såg han världen, först två år som sjöman för om masten på segelskepp på många hav och sedan under sina studier vid de framstående polytekniska instituten i Hannover och Zürich 1860–1862. Han blev lärare i kemi och naturalhistoria vid den tekniska realskolan i Helsingfors år 1866 och avancerade senare (1872) till lärare i kemisk teknologi vid den polytekniska skolan, sedermera polytekniska institutet. Han kvarstod som lärare i ämnet ända till 1903.

Det var först under den tid Qvist var prodirektor (1874—1880) och direktor (1880—1903) vid Polytekniska institutet som den utveckling tog fart, som sedan år 1908 ledde till upprättandet av Tekniska högskolan. Då hade redan Qvist — till sin ovanskliga ära — blivit avskedad av Bobrikoff fem år tidigare. Men Tekniska högskolan fick Qvist uppleva — han dog år 1910. Institutets utveckling var till stor del hans förtjänst.

Qvist var en praktisk man, med båda fötterna på jorden, och gemytlig, en hedersknyffel, som kom väl överens håde med kolleger och myndigheter — utom med Bobrikoff, förstås. Bland studenterna gick Qvist under namnet »Fader vår».

Han hade bedrivit tjärfabrikation tillsammans med sina bröder både i Kangasniemi nära St Michel och i Turenki i Tavastland. Den tiden, då de första järnvägarna i Finland byggdes och mineralsmörjor ej ännu tagits i bruk och de vanliga fetterna ej räckte till behövdes det nya smörjmedel, och Qvist synes ha fabricerat smörjor ur trätjära genom torrdestillation. Härvid stötte han på det kristalliserande kolvätet reten, som han lät sin medarbetare, sedermera professor Henrik Alfred Wahlforss undersöka vetenskapligt. Qvist ställde också upp Finlands första cementfabrik i Savio, men den måste stänga på grund av att myndigheterna ej kunde få i sitt huvud att inhemsk cement kunde vara lika bra som den importerade engelska. Man förstår att han var ivrig att få till stånd en materialprovvningsanstalt, vilket också lyckades år 1890. Ur den har Statens tekniska forskningsanstalt sedermera utvecklats sig.

Det berättas att Qvist bedrev en liten affär med att extrahera äppelsyra ur bären från de stora rönnar som växte på Polytekets gård. Qvist leveranser var en längre tid den enda källan för den äppelsyra som såldes av firman Kahlbaum i Berlin.

I Finska kemistsamfundet höll Qvist styvt på praktiska, teknisk-analytiska bidrag till programmet, till skillnad från de vetenskapliga, som dock snart genom Aschan och Komppa kom att dominera. Han var samfundets ordförande 1892, 1894 och 1897. Hedersledamot blev han 1899.

#### *Edvard Hjelt.*

Edvard Hjelt (1821—1921) var en framstående forskare och lärare, men genom ödets skickelse blev han mest känd som historiker, rektor, byggherre till, man kan säga, ett nytt Kemicum, regeringschef, självständighetsman, diplomat och upphovsman till den tyska hjälpen 1918. Man har försökt göra honom också ansvarig för det operettartade valet av en tysk kung för Finland så sent som den 9 oktober 1918, blott en månad före Tysklands sammanbrott, men här låg nog skulden både moraliskt och juridiskt på riksföreståndare Svinhufvud och regeringschefen Paasikivi.

Hjelt blev student vid 17 års ålder och magister med kemi som huvudämne vid 20. Han tänkte sig en bana som industrikemist, men både hans lärare vid universitetet, den sympatiska professor Chydenius och Ernst Qvist avrådde honom och sade att det ej fanns utsikter till en kemisk industri i Finland. Hjelt lät sig dock ej avskräckas, fick Ekestubbes stipendium för 2 års utlandsvistelse, studerade vid polytekniska institutet i Dresden och praktiserade vid en svavelsyrefabrik i Mügel, en halv timmes järnvägsresa söderut från Dresden (1875—1877).

När han kom tillbaka till Finland försökte han få plats vid en nystartad svavelsyrefabrik i Åbo, där för övrigt Ossian Aschan då praktiserade. Men fabriken leddes av en inkompetent ingenjör från Sverige och gjorde konkurs, vilket bragte kemisk industri i Finland i vanrykte för 25 år framåt.

Ett år som t.f. kemilärare vid Mustiala lantbruksinstitut gav Hjelt smak för lärarkallet. Han fick ett stipendium för studier i kemi i utlandet, närmast för att göra sig kompetent som lärare vid blivande industriskolor. Ingen i Finland kunde råda honom vart han lämpligen skulle bege sig. Han reste därför först över till Uppsala för att fråga professor Cleve. Denne varnade för Paris och rådde honom att i stället bege sig till Wislicenus i Würzburg. Där började Hjelt som den första från Finland arbeta inom terpen- och kamferområdet, som alltsedan dess så ivrigt bearbetats i vårt land. Han gjorde följande sommar en doktorsavhandling om kamforonsyra färdig hos den berömde Adolf von Baeyer i München. Där arbetade då bl.a. Emil Fischer, och Hjelt blev bekant också med Erlenmeyer senior, han med kolven. Hjelt disputerade i Helsingfors i oktober 1879. Kamforonsyrans formel var visserligen fel — vilket dock hade sina förklarliga skäl — men annars var avhandlingen inte alls illa.

Professor Chydenius hade då svårt insjuknat och Hjelt hade inte bara att sköta all undervisning i kemi vid universitetet utan också att enligt tidens fordringar genom en ny stor avhandling göra sig kompetent för professuren.

Han lade manken till. Arbetet om kamforonsyra hade väckt hans intresse för laktoner. Han arbetade med dem om vintrarna i Helsingfors och somrarna 1880 och 1881 hos Fittig i Strassburg. I mars 1882 var den nya avhandlingen färdig. Den var ett utmärkt verk, som innefattade inte endast ordinär organisk kemi utan också de första i Finland publicerade bestämningarna av reaktionshastigheter och tillämpningar av van't Hoff's och Lebel's då splittrerna stereokemiska teorier, som gillades av Wislicenus men kritiserades av Fittig, för att inte tala om den konservative Kolbe, som Hjelt också hade besökt.

I juli år 1882 blev Hjelt som enda sökande med färdig avhandling utnämnd till ordinarie professor i kemi vid 27 års ålder.

Edvard Hjelt var son till professor i patologisk anatomi och, som det då hette, statsmedicin Otto Edvard August Hjelt, som fortfarande satt i konsistorium när sonen tog säte där. Hemmet var pietistiskt religiöst och Edvard Hjelts uppfostran hade i huvudsak skötts av hans mor, född Thuneberg, en begåvad och varmhjärtad dam. Edvard Hjelt hade en idealistisk livssyn och visade i alla livets skiften en högst aktningvärd plikt känsla och idealitet, som visade sig i att han utan att tänka på bekvämlighet och materiella fördelar åtog sig också betungande och otacksamma uppdrag. Bland dem kan nämnas ett arbetsdrygt och obehagligt revisionsuppdrag då det konstaterats oordning i kvesturens affärer. Han blev därigenom emellertid också specialist på universitetets förvaltning och vann sina kollegers förtroende. I Finska kemistsamfundet var han ordförande 5 gånger (1893, 1895, 1898, 1901 och 1906) och mycket uppskattad för sitt värdiga sätt att leda förhandlingarna. Karakteriskt nog åtog han sig för det allmänna bästa att samtidigt att som han var ordförande också vara samfundets kassör 1893–1895 och år 1900 finner vi honom som t.f. sekreterare, ett föredöme för senare tiders barn. Kassörskapet var inte den tiden kanske så betungande, medlemsavgiften var fem mark, medlemsantalet ca 40 och saldot uppgick vid hans tillträde till befattningen år 1893 till 48 mark 72 penni. Hedersledamot blev han år 1915.

Hjelt var en lysande talare och medryckande, human och populär lärare. På hans tid kunde fil.kand. examen avläggas på tre eller t.o.m. endast två år, detta trots att han som en nyhet införde specialarbetet i kemi.

De personliga uppgifter som nu följer är tagna ur den sympatiska bok om Edvard Hjelt, som skrivit av hans äldsta dotter, Ester Hjelt-Cajanus.

Hjelts religiösa uppfostran gjorde att han höll söndagsskola för vaktmästarnas barn och att han brukade gå omkring i staden på julaftonsdagen tillsammans med sin äldsta dotter och dela ut varmbröd åt folk som såg hungriga ut.

Hans nära förbundenhet med sin mor under uppväxttiden var kanske den psykologiska förklaringen till att han gång på gång attraherades platoniskt och dygdädel till damer av den idealistiska sorten. Det hindrade inte honom att vara lyckligt gift och ha 8 barn. Vi ser också att han senare egnade ett av sina inskriptionstal åt ämnet »Kvinnorna vid Helsingfors universitet». Då hade studentskorna först året förut befriats från att av kansler anhålla on »dispens från sitt kön».

Ännu långt efter det Hjelt blivit professor hade han det mycket knappt ekonomiskt. Det berodde inte på att ha ej skulle ha kunnat hushålla och försörja sin växande familj om slutligen 10 personer, utan på att han i sin välvilja dessutom försörjde sin slarviga äldre bror och hans familj om inalles 8 personer. När han

flyttade in i den stora prefektbostaden vid nuv. Snellmansgatan hade han under flere år ej råd att skaffa möbler, utan en del rum fick stå nästan tomma.

Hjelt skrev och talade mestadels svenska, men var i princip finsksinnad och hörde en tid till det ungfinska partiet. I förra seklets Helsingfors flanerade allt herrskapsfolk på Espen kl. 3 på dagen, de svensksinnade på Norra Espen och de finsksinnade på Södra, bland dem Hjelt.

Han hade ett övertygande sätt och en utomordentlig förmåga att väcka förtroende eller åtmistone tilltro hos både goda och onda. Ett utslag av detta var att han upprepade gånger av oroliga föräldrar både i Tyskland och Finland anförtroddes att eskortera deras vuxna döttrar på resor mellan de båda länderna. Dessa uppdrag fullgjorde han con amore, till både flickornas och föräldrarnas belåtenhet. Honni soit qui mal y pense!

Det förtroende Hjelt åtnjöt hjälpte honom att 1886–1887 få anslag till ett praktiskt taget nytt Kemicum, tillbyggnaden vid Regeringsgatan, som allt ännu används, om också Kemicum nu är utsatt för vräkning.

Hjelt publicerade 80 arbeten i organisk och 8 i oorganisk och analytisk kemi, 15 i kemins historia, 6 minnesteckningar, 25 memoarer eller politiska skrifter, 16 akademiska tal och uppsatser samt många populära framställningar, sammanlagt ca 200 arbeten. Bland hans organisk-kemiska arbeten märkes en beskrivning »Die Lactone» i den kända »Sammlung chemischer Vorträge». Vidare publicerade han om samband mellan sammansättning och smältpunkt, o-xylylenbromid och syntes av ftataldehyd, inverkan av anilin på estrar i närvaro av natriummetall, om symmetrisk dietylbarbitursyra, dibromaceton, bärnstenssyrederivat och om ledum-kamfer. Han utgav flere smärre läroböcker och tillsammans med Aschan den både hos oss och i de andra nordiska länderna använda läroboken i organisk kemi »Hjelt — Aschan», var första upplaga kom ut år 1893 och den fjärde år 1922. Han bidrog med 6500 sidor i Roscoe — Schorlemmers »Ausführliches Lehrbuch der organischen Chemie», vilket vittnar om otrolig flit, låt vara att Aschan deltog i arbetet. Sedan Hjelt blivit rektor var det tyvärr slut med hans experimentella forskning. Han kunde dock samla sig till sitt klassiska verk Geschichte der organischen Chemie, som blev färdigt under första världskriget (1916).

Ett omfattande utredningsarbete »Studier i apoteksfrågan (1910)» var av stort intresse och förskaffade honom hedersledamotskap inte endast i Apotekarföreningen i Finland utan också i Farmaceutiska föreningen i Stockholm.

Hjelt var t.f. rektor för universitet redan då februarimanifestet kungjordes 1899 och han fick som rektor och senare vicekansler

rida ut de båda perioderna av ofärdsår, under nappatag med både Bobrikoff och Seyn.

År 1899 blev v. Plehwe t.f. kansler för universitetet. Han var en tysk-ryss av adlig härkomst, hade gjort karriär i den ryska hemliga polisen och var författare till det olagliga februarimaniestet. Han kunde dock språk och hade artigt sätt, till skillnad från Bobrikoff.

I april 1900 inspekterade v. Plehwe universitetet och Hjelt hade ställt till stor förevisning. Bl.a. hade det byggts upp konstiga apparater på Kemicum och i studenthuset samlades 300 studenter, bland dem många kvinnliga, och herrarna alla i frack. v. Plehwe var imponerad, sade visserligen att samovaren tycks vara det enda som Finland importerat av den ryska kulturen, men också att studenterna i Helsingfors själv skapat sig en egen vacker uniform, och därför inte behövde den ryska, var ändamål närmast var att dölja den smutsiga skjortan.

Bobrikoff och Plehwe väntades samarbeta, men visade sig vara hemliga rivaler. Hjelt lyckades, som genom hypnos har det sagts, få Plehwe att anse universitetet som sin domän där Bobrikoff inte hade något att göra. Genom att spela ut de båda potentaterna mot varandra lyckades Hjelt förhindra det värsta. Det har sagts att efter Per Brahe har ingen inlagt så stor förtjänst om Finlands universitet som Hjelt. Men rektors vardag var vansklilig nog. Kosackkravellerna (1902) utspelades på torget mellan Kemicum och universitetet och på gatan utanför Hjelts bostad, där hans barn stod i fönstren i tredje våningen och spottade på kosackerna nedanför. Eugen Schauman slipade då sin puukko på Kemicums slipsten och gick senare tidigt om morgonen den 16 juni 1904 genom Kemicum över till Senaten där han gömde sig och senare på dagen sköt Bobrikoff och sig själv. Studenterna spelade en huvudroll i värnpliktsstrejken och Bobrikoff hotade både med drastiska straff och med att stänga universitetet. Det gällde att medla och övertala, pruta ner relegeringstider och få gendarmerna att utlämna häktade studenter åt universitetspedellerna. Värst blev det när det aktiva motståndet satte in. F. W. Klingstedt kokade i hop kvicksilverfulminat som tändsats till en bomb i nattens tysta timmar på kvantitativten, men det fick Hjelt aldrig reda på. Men redan året därefterinnan anförtrorde en av Hjelt befriad student (Biaudet) att en av hans kamrater tillverkat bomber och borde varnas. Hjelt kalla på den häpne bombtillverkaren och fick honom att sänka sina produkter i havsens djup. Samma kväll fick Hjelt, med kallsvetten ännu i pannan, som rektor officiera vid universitetets hundraårsfest med anledning av Runebergs födelse. Efter Bobrikoffs död deporterades till Ryssland som repressalie professorerna R. A. Wrede och Th. (Teppo) Homén — som enligt Plehwe var »grand agitateur» — och likaså kuratorn för Nyländska avdel-

ningen, docenten, sedermera professor Ernst Estlander. Hjelt reste till Petersburg och schackrade med Plehwe om förvisningsorter och tider. Plehwe hade då avancerat till rysk inrikesminister, men en vecka senare blev han dödad vid ett attentat i St. Petersburg.

Vid inskriptionen i september 1904 höll Hjelt ett tal som utan skäl kritiserades av studenterna och av tidningar i Sverige som alltför underdånigt, samtidigt som den ryska t.f. universitetskanslern Oerstroem beskyllde Hjelt för att ha uppviglat studenterna genom sitt tal! Studenterna läste upp en protest vid inskriptionen och ett par månader senare utlyste de rektorn ovetande ett protestmöte i Gamla studenthuset för att diskutera studiestrejk. Det var mot gällande bestämmelser, Hjelt förbjöd mötet och lät pedellerna låsa och bevaka dörrarna. Men studenterna samlade sig i stora skaror framför huset och det artade sig till en »Vanhan valtaus» år 1904. Då gav sig Hjelt själv dit, hans fru (Ida Sofia f. Åström) vägrade släppa honom dit ensam och kom med. Hjelt uppmanade studenterna att gå hem, några gjorde det men andra kom i stället. Så kom det bud att en stor hop studenter fyllde den stora järntrappan på Kemicum framför prefektbostaden och en del av gatan utanför. Hjelt begav sig hem, fick höra på obehärskat tal, men vägrade ge efter. Saken hänsköts till inspektorskollegiet, som gav honom förtroendevotum.

Efter storstrejken 1905 blev Hjelt så småningom senator och medlem av regeringen, först på den vakans som motsvarar den post i undervisningsministeriet som nu innehas av herr Louekoski, och senare regeringschef — det hette då viceordförande i senatens ekonomidepartment. Hjelt efterträdde Leo Mechelin, som fått misstroendevotum i lantdagen av gammalfinnar och socialister i ohelig allians. Stolypin var nu Rysslands starke man. Vid två audienser hos honom fick Hjelt höra honom hota med belägringstillstånd, se honom rita ett kors på bordet, höra honom säga »vi har militären och vi har fästningarna», »om ni ej lyder är ni rebeller» osv. Förberedelser vidtogs att bombardera Helsingfors från Sveaborg. Stolypin blev visserligen år 1911 mördad av en av sina egna dubbelagenter, men förtrycket blev bara värre. När Hjelts senat tog avsked, efterträddes den först av en gammalfinsk senat som blott några månader senare måste ge rum för den sk. amiralernas senat av rena ryssar och förryskade finnar, som stod i intimt samarbete med generalguvenör Seyn.

Hjelt blev nu för ett par år t.f. kemiprofessor och sedan vicekansler för universitetet. T.f. kanslern Markoff var ryss, men hade gått i kadettskolan i Fredrikshamn. Han motsatte sig ej direkt förryskningsåtgärderna, men sölade så mycket han vågade. Världskriget bröt ut, ett nytt förryskningsmanifest utfärdades i november 1914 och likaså ett specialprogram att nästan helt

förryska universitetet med både föreläsningar och tentamina på ryska. Det skulle vara färdigt år 1920.

Nu blev Hjelt desperat. I motsats till många bankdirektörer och industriledare gav han sin välsignelse åt jägarrörelsen, blev ordförande i dess »De äldres råd» och reste själv så vicekansler han var till Sverige och Danmark år 1915 och sammanträffade där både med svenska utrikesministern Wallenberg och med tyska militärattachéer och agenter. Ryssarna fick småningom reda på hans förehavanden och han uppkallades till gendarmförhör i Helsingfors i februari 1917. De förberedde en stor landsförräderi-process, men revolutionen i mars 1917 räddade både Hjelt och många andra.

I augusti 1917 sändes han som representant för självständighetsrörelsen till Tyskland. Svinhufvud sade åt honom »skaffa tyskarna hit, annars reder vi oss inte». 26 november 1917 besökte Hjelt Hindenburg och Ludendorff i det tyska högkvarteret och framlade självständighetsrörelsens program. Ludendorff lät hälsa att Finland borde snarast möjligt förklara sig självständigt och vidtaga åtgärder för att driva ut de ryska trupperna. Tyskland skulle hjälpa med vapen. Ludendorffs budskap inlärdes utantill av en kurir, som frambefordrade det till Helsingfors. 8 dagar efter det Ludendorff talat förklarade regeringen Finland självständigt och två dagar senare godkände lantdagen självständighetsförklaringen, visserligen efter omröstning och mot socialisternas röster.

Den röda statskuppen i Helsingfors 28 januari 1918 var en överraskning för både Hjelt och många andra. Hjelt lyckade trots många svårigheter få till stånd att jägarna och stora vapenlaster sändes till Vasa. De måste resa civilklädda, ty tyska utrikesministeriet ville inte äventyra de då pågående vapenstilleståndsförhandlingarna med sovjetregeringen.

I februari ställdes Hjelt på tinnarna i templet. Han hade då blivit officiellt utnämnd till Finlands sändebud i Berlin. Den 11 februari uppsades vapenstilleståndet mellan Tyskland och sovjetregeringen och skulle upphöra en vecka senare. Tyska högkvarteret hade nu fria händer. 14 februari telegraferade Ludendorff till Hjelt och uppmanade Finland att sända en officiell begäran om brådsakande hjälp.

Hjelt hade nu att fatta ett beslut, som kanske skulle avgöra Finlands öde för lång tid framåt. Det fanns ingen användbar telegraufförbindelse med den lagliga regeringen i Vasa, en kurir av och en skulle behöva minst tio dagar och det nya tyska fälttåget mot Ryssland väntades bli kort. En tysk landstigning i Finland skulle sannolikt snabbt göra slut på kriget där, men den skulle också mer eller mindre binda Finland vid Tysklands sida under världskriget och kanske som lydland under Tyskland för långa framåt.

Från finska legationen i Stockholm och på hemliga vägar direkt från det av röda besatta Helsingfors kom alarmerande rapporter: »Den akademiska ungdomen är i yttersta fara — de borgerliga är i fara att bli mördade eller dö av svält.» En utförlig rapport undertecknad av representanter för universitetets tjänstemannakår, läkare och affärsmän bönföll om snabb militär hjälp från Sverige eller Tyskland —

Hjelt tvekade inte. Tillsammans med professorn i internationell rätt Rafael Erich avfattade han ännu samma dag en officiell begäran om hjälp både till den tyska regeringen och det tyska militära högkvarteret.

Fem dagar senare startade tyskarna sin s.k. järnvägsoffensiv, som inbragte ett ofantligt krigsbyte och förde dem till både Reval, Narva och Kiew. Samma dag fick Hjelt ett brev från senator Renvall i Vasa, som gav Hjelt rätt att fråga om Tyskland kunde hjälpa Finland med trupper, av vilka det dock ej skulle behövas någon större numerär. Följande dag var Hjelt igen i tyska högkvarteret hos Ludendorff, som utlade planen för den tyska landstigningen i Finland sådan som den senare också utfördes. Hjelt sände rapport om detta med kurir till Vasa. Mannerheim blev rasande, ty han hade åtagit sig överbefälet på villkor att ingen utländsk hjälp med trupper skulle begäras. Emellertid lugnade han sig småningom och påskyndade t.o.m. senare den tyska landstigningen, när offensiven mot Tammerfors ej gick enligt planerna. De röda visade sig vara större krigare än väntat. Hjelt synes ha tagit Mannerheims missnöje ganska lugnt ty Hjelt var ännu vid det laget betydligt äldre i tjänsten som moralisk och politisk ledare och självständighetskämpe än Mannerheim. Den som då levde och svalt i Helsingfors, där de röda var på vippen att inkalla hela befolkningen till arbetstjänst, kan inte annat än vara tacksam mot Hjelt. Det är att märka att den tyska regeringen och i synnerhet socialisterna i den tyska riksdagen var ganska ovilliga att hjälpa det vita Finland och det tyska högkvarteret samlade just då alla tillgängliga krafter i Frankrike för den avgörande stora offensiven, som skulle slå ut Frankrike och England innan den amerikanska hjälpen hann fram. Offensiven började sedan den 21 mars. Hjelts hypnotiska förmåga behövdes också för att vinna Ludendorff!

Bild 3 är ett porträtt av Hjelt från år 1918. Man ser en viss yttre likhet med Hindenburg, som han ju också underhandlade med.

Hjelts sista platoniska flamma hade fått honom djupt intresserad av den tyska teologen och filosofen Johannes Müllers något dimdunkla läror. I detta råkade han i sinom tid en själsfrände i den utkorade konungen av Finland, prins Friedrich Karl av Hessen, som synes ha varit en ansvarskännade, inåtvänd och



Edvard Hjelt, 1918.

något sentimental herre, som kallade Finland »das Land der ernsten Augen». Därmed tänkte han väl närmast på Edvard Hjelts uppsyn.

I början av 1919 kunde Hjelt i sin tur hjälpa Ludendorff, som hotades av de tyska revolutionärerna. Ludendorff förseddes med finskt pass under namn av legationsrådet Erik Lindström — initialerna E. L. i underkläderna skulle passa in på Erich Ludendorff! Med avrakad mustasch och stora brillor påminde den avdankade fältherren på ett slående sätt om kommerserådet Lindblom i Åbo. Hjelt åkte själv med i bilen och Ludendorff klarades över till Sverige. Historien kom ut genom de svenska tidningarna och Hjelt hade en del att förklara för den nya

riksföreståndaren Mannerheim, som sedan gammalt inte var god på Hjelt.

I avslutningen av sina memoarer skriver Hjelt år 1920: »Universitetet har i någon mån fått avstå från sin gamla tryggande självstyrelse. Man måste hoppas att denna förändring icke skall hava till följd, att universitetets liv och verksamhet göres beroende av den inre partipolitiken och dess växlingar på ett sätt, som vore ogynnsamt för dess vetenskapliga och kulturella uppgifter. Men faran att så kunde gå bör icke lämnas obeaktad.» Det var profetiska ord.

## Om månstenarnas kemiska sammansättning.

Sammandrag av föredrag  
vid Finska Kemistsamfundets 80-årsjubileum 13. 12. 1971.

*Av H. B. Wiik*

De 4 bemannade Apollo-färderna och den obemannade Luna 16 expeditionen har nu sammanlagt givit oss ca 175 kg måndamm och månstenar. Undersökningen av detta material har varit intensiv. Den bild av månens kemiska sammansättning som gavs vid den första Houstonkongressen i januari 1970, och som presenterades för Kemistsamfundet några veckor senare, har i stort sett förblivit oförändrad. Sålunda ha vi bekräftat att månens kemi starkt skiljer sig från både jordens och meteoriternas. Det finnes mera av de svårflyktiga och mindre av de lättflyktiga elementen på månen. Det fanns 10 ggr mera titan, zirkon, yttrium, krom etc på månen än i jordisk basalt, fnen mycket mindre H, Cl, Hg, Na, K etc. Egendomliga avvikelser från denna flyktighetsregel finnes. Så är nickelhalten på månen försvinnande liten i jämförelse med jorden och meteoriterna. Då järnhalten på månen är större borde också nickel- (och kobolt) halterna vara det. Så är inte fallet. Platinametallerna förekommer också på månen sparsammare än på jorden. De sällsynta jordmetallerna förekomma på månen tiotal gånger rikligare än på jorden och i meteoriterna. Förhållandena mellan dessa element är dock desamma där liksom här. Ett undantag är Europium. Europium är lika ytterst sällsynt på månen som på jorden. Man har förklarat denna egendomliga anomali med att Europium, som ju är både 2 och 3-värd, på månen skulle förekomma företrädesvis 2-värd och därför anrikats i plagioklasen. Detta mineral skulle ha kristalliserat tidigt och sjunkit nedåt i mänskorpan dragande med sig nästan allt Europium. Att månen ej lyckats hålla sina lättflyktiga gaser är ju ganska klart, men vart har det tunga kvicksilvret tagit vägen. Kolhalten är också synnerligen låg och mycket lägre än på jorden och i meteoriterna. Måndammet innehåller dock något mera kol och en hel del mera nickel än månstenarna. Detta har tytts så att måndammet innehåller ca 2 % meteoritiskt material. Meteoriterna innehålla ju ganska rikligt C och Ni. All bly på månen visade sig vara radiogent. Uran och toriumförhållandena till de olika radiogena blyisotoperna likson K/Ar och Rb/Sr förhållandena har givit oss månens ålder d.v.s. de tidpunkter då månens yta stelnade. Som känt var ju dessa åldrar ytterst höga (3.3–4.7 miljarder år). Månen stelnade alltså samtidigt som jorden, men sammansättningar av de två stoffmoln varur dessa himlakroppar bildades,

har antagligen varit en hel del olika. Dessutom kan differentiationen ha haft ett olika förlopp.

En del fakta tyder dock på att vare sig på jorden eller månen differentiationen varit så grundlig som man tidigare trott. Fastmer förefaller det som om månstenarna — likasom de djupliggande jordiska bergarterna och meteoriterna — skulle ha en hel del av sin ursprungliga odifferentierade sammansättning kvar. Statistiska undersökningar av sammansättningarna visa geometriska serier hos atomproportionerna som säkert skulle ha försvunnit om en selektiv differentiation förekommit. — Intressanta är de spår efter utdöda radioaktiva nucklider som förekomma. Så förekommer  $Xe^{129}$ , som tyder på att det engång funnits  $J^{129}$ . Efter det den nucleara elden slocknade fanns det alltså  $J^{129}$  som naturligtvis snabbt började sönderfalla. En hel del  $J^{129}$  fanns emellertid ännu kvar då stenarna stelnade annars skulle vi ju nu inte finna gasen  $Xe^{129}$  inbakad i dem. Därav drar vi den för denna forskning så viktiga slutledningen att det räckte högst 50–300 miljoner år mellan eldens slocknande och mänskorpan stelnande. — Viktiga resultat är ju också att vi nu vet solvindens sammansättning. Den bestod som väntat av 99 % H men också något ädelgaser samt N och C. Inga biogena föreningar påträffades.

## Study of Low Molecular Weight Proteolytic Enzymes

by Johan Bjorksten, Elliott R. Weyer, and Stephen M. Ashman

*Bjorksten Research Laboratories, Inc., Madison, Wisconsin*

### Summary

A search was made for microorganisms capable of dissolving insoluble macromolecular fractions from aged mammals. From such microorganisms we obtained proteolytic enzymes which pass intact ultrafilters and dialysis membranes nominally cutting off at mol. wt. 10,000 and are retained by membranes cutting off at 1000 mol. wt. Such enzymes have been found in 3 taxonomically identified and several isolated but unidentified micro-organisms.

At least three of these enzymes differ in activation-inactivation behavior. Molecular weights determined by molecular sieve methods have given values for one of these enzymes of  $5700 \pm 20\%$  and for others in the possible range 5000-8000.

Proteolytic properties have been determined by the Congo-coll method, caseinolysis, and by the extent of liberation of tritium from the insoluble fraction of muscle tissue of aged rats who had received tritiated tyrosin at birth.

### General Approach

In the study of insoluble, apparently crosslinked macromolecular fractions in organs of old humans and animals difficult to hydrolyze with any enzyme, the observation was made that some of these fractions could be fairly easily broken down by certain living organisms, or with macerates from these organisms, but not to any comparable degree by any available hydrolytic enzyme, or enzyme combination.

On the other hand, a very slow but progressive decomposition could be attained even with ordinary proteolytic enzymes if these were applied in huge concentration (say equal in weight to the substrate) and the solutions renewed daily. An explanation for this observation is that to achieve hydrolysis in these instances we need first of all to overcome steric hindrances. The slight degree of efficacy of the ordinary hydrolases is consistent with the view that these can attack the conglomerate molecules only from the outer surface, while enzymes capable of efficient attack can better penetrate aggregates and act on a much larger total surface.

Such a view is consistent with the crosslinkage theory of aging (1, 2). If the gerogenic high molecular substances have indeed been formed by cumulative random crosslinkages over a lifetime, it is to be expected that compact, sterically hindered agglomerate structures will result, which cannot be easily dissolved by highly specific hydrolases, but rather will yield to enzymes of less specific hydrolytic activity which are capable of overcoming the steric hindrances and of penetrating into the compact structures involved. This means that enzymes capable of hydrolyzing such structures would have to be sufficiently small to be capable of entering through the meshes even in very tightly knit conglomerate molecules.

We therefore embarked on a search for such very small enzymes. This quest can be divided into the following phases:

1. Separation of gerogenic complexes of high resistance to enzymic hydrolysis.
2. Searching for organisms capable of breaking down such complexes.
3. Searching for organisms capable of breaking down artificially heavily crosslinked macromolecular conglomerates.
4. Isolating the active hydrolases from such organisms.
5. Separating the lowest molecular weight fractions of these enzymes.
6. Studying the effect of such low molecular enzymes on the gerogenic fractions.

#### 1. Separation of gerogenic complexes from the human brain.

The procedure of isolation followed, in its general outline, that employed in a previous study of the insoluble fractions of old human heart tissue(3). 1040 g of cortex from an 80 year old human brain was dispersed in 10 times its volume of acetone, to which an equal volume of water was added, and the remaining solids filtered off and washed 3 times with a smaller volume of 50 % acetone. After drying, the remaining solids were extracted with a 2:1 by volume mixture of chloroform and methanol, using a Soxhlet extractor overnight. To make certain that the extraction was complete, the residue was dried, pulverized and re-extracted in the same manner for another night. The remaining material, 90 grams, air dry, now free from water solubles, fats and phospholipids, was dispersed in water, and digested with agitation at pH 9-11 by the addition of 300 ml. n/10 phosphate buffer and 6 mg of "Pronase" (a protease mixture containing at least 4 protein hydrolases, from *Streptomyces griseus*) for 24 hours at 37°C. As the pH declined during the hydrolysis, it was readjusted repeatedly by addition of sodium hydroxide to bring the alkalinity back to the desired range of

pH 9-11. "Pronase" was added every 24 hours, while microbial contamination was suppressed by means of a few drops of toluene.

The material was then separated by centrifugation and washed with water on the centrifuge until the clear supernatant, after centrifugation, evaporated on a watch glass without showing traces of solids. The resultant material, about 15 % of the starting material, was insoluble in 8M urea, phenol, acetamide, formamide, strong detergent solutions with or without additions of urea or guanidinium chloride, dimethyl sulfoxide, dichloroethane, hexane, and chloroform-methanol in proportion 2:1. It was also insoluble in 8M urea and 6M guanidine chloride with addition of 20 % of thioglycolic acid or equivalent reducing agents, and insoluble in alkyl aryl sulfonate detergents, and in various combinations of the above. Insolubility in anhydrous hydrofluoric acid further indicated its crosslinked condition(4). This generally insoluble residue could however be apparently dissolved by anhydrous hydrazine at room temperatures.

Similar insoluble fractions could be prepared also from old human heart, muscles, and liver; and from heart, muscles, liver, kidney and brain from senile rats.

We initially used the insoluble material from human brains because we obtained the highest yields of insolubles from that organ, and because human brains are large and relatively easily available in comparison with brains from other species of similar longevity.

## 2. Searching for organisms capable of breaking down insoluble fraction from aged human brain.

R. Dubos originated the method of searching for organisms capable of breaking down substances, by exposing the medium containing the substance in question as an exclusive source of a nutrient needed by the organisms. In a variant of this technique, we dispersed one gram of the insoluble gerogenic fraction prepared as just stated, in 100 ml of 1.5 % agar gel, which was then poured into Petri dishes. These were inoculated with suspensions of media rich in bacteria, such as rich garden soil, sand contaminated with proteinaceous substances, sewage of various kinds, putrefying organic material, or were exposed to air at various localities.

After incubation for 1-7 days at 37°C, circular halos were sometimes noted on the agar, indicating solubilization of the

dispersed insoluble particles. Organisms causing such dissolutions were subcultured and studied. These organisms proved capable of attacking and dissolving the enzyme-and-solvent-resistant fraction from aged human brain.

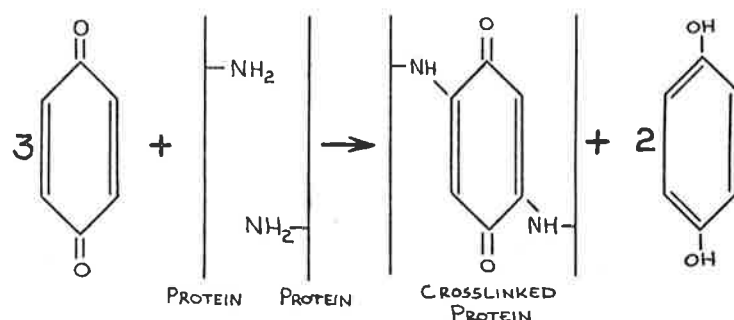
Several species were found which possessed the halo forming properties in varying degrees, and with the same wide difference between strains. Many of these were not identified taxonomically, but among those which were may be mentioned *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces annulatus*, and *Bac. cereus*. Considerable variation in halo-forming ability existed between strains of the same species. These were often greater than the differences between different species.

It would have been interesting to pause here to define the various organisms, optimize the enzyme production and specificities of each, determine whether the differences in halo size depended on molecular weight or on quantity secreted, study influence of matrix media, pH, temperature gaseous ambient, activators, inactivators and enzyme induction physiology for each organism. However, our purpose was beyond this and we therefore did only the minimum of work necessary to provide adequate tools for the next step.

It appeared interesting to determine whether these organisms were also capable of breaking down very heavily cross-linked insoluble artificially prepared protein agglomerates. To this end we added 50 grams of para-benzoquinone (Eastman) to 150 grams of Grayslake pigskin gelatin, (315 Bloom) dissolved in 1 liter of 0.5 molar phosphate buffer, pH 7.7. After 32 days at room temperature the firm dark gel was broken up in a Waring Blender, dialyzed against tap water for five days, washed, filtered on a Buchner funnel and centrifuged many times with water to remove excess quinone over the following two weeks. Still impure, the same was left to stand with 500 ml of 3A alcohol (ethyl alcohol denatured with approximately 5 % methyl alcohol) for the next two years. Finally the sample was Soxhlet extracted with the same solvent for 48 hours, removed, dried and stored at room temperature for an additional five years and again re-extracted on Soxhlet as above, prior to use. This crosslinkage treatment, of more than 7 years duration, should have allowed adequate time for the crosslinkage agent present in excess even after the two year standing with alcohol, to penetrate and to act in most of the possible sites of the large molecules.

We have chosen for the prime example a preparation made with p-benzoquinone as the crosslinking agent, because of the

hydrothermal resistance of the quinone bonds. In this case the major crosslinking reaction is(5):



Ciferri, *et al*, in their careful quantitative studies of the crosslinking reactions (6) (7) have shown that quinone linkages are incomparably more stable than the aldehyde linkages and even more stable than chromium linkages. While the quinone reaction is of a single type, there are five competing reactions in the aldehyde crosslinkage. Although the initial reaction with lower aldehydes is impressively rapid, the resultant crosslinked products do not compare in stability with the quinone tannages. Furthermore, the work done with old hearts tends to emphasize the possibility of quinone tannages as a factor in long term effects (3).

A second crosslinked product was made with aluminum tanned material because of the prevalence of aluminum among those metal ions which increase dramatically in concentration with age (8), and because of the findings of Zinsser, Butt and Leonard (9) of X-ray diffraction evidence in human aorta of crosslinkages which are consistent with the dimensions of aluminum oxide linkages.

6.6 grams of aluminum acetate (24 % basic solution - U.S. Vanadium Corp.) was added to 66.7 grams of casein dissolved in 450 ml of water to which 9 ml of a 1 molar phosphate buffer (pH8.0) and 33 ml of 1 N NaOH solution had been added. After 22 days at 53°C the sample was blended with four times its weight of water, centrifuged and the precipitate transferred to a Soxhlet extraction thimble where water extraction was carried out for 66 hours. Finally the sample was extracted with acetone several times and air dried prior to use as a substrate.

The following tabulation compares the halo formation of a series of organisms as applied to the insoluble fraction made

from human brain, with those made from the first mentioned of the above preparations by following the identical preparative scheme:

Organisms designation	Halo Width on Synthetic insoluble fraction	Halo Width on insoluble fraction from human brain
1.	8 mm	4 mm
2.	4	2
3.	2	2
4.	4	4
5.	8	4
6.	4	2
7.	2	4
8.	12	4
9.	4	2
10.	2	2
11.	8	2

These figures are not completely comparable, as they relate to separate tests, and observation was made at the time the halos seemed well enough developed for observation - not necessarily at identical stages of development. On the whole, however, they are indicative of a close parallel between the synthetic and natural insoluble fractions. No amount of waiting would have enabled the other organisms to match the spectacular 8-12 mm halos of organisms 5, 8 or 11 on artificially crosslinked gelatin. On the other hand, the inconsistency of organism 7, the only organism which shows a larger halo on natural than on synthetic hardcore, might well be due to the fact that these were run separately, under somewhat different conditions.

It is thus seen that with this one uncertain exception, the organisms active on the human brain insolubles were at least as active on the artificially crosslinked proteins, and in all but possibly one instance, were more active.

It would have been interesting to pause here to determine the sites and frequencies of the crosslinkages, the degree of uniformity of the peptide bonds, the amino acid sequences in the artificially crosslinked media before and after each preparative step. However, our purpose was beyond this and we therefore did only the minimum amount of work necessary to provide the tool needed for the isolation of gerolytic organisms.

*Isolation of low molecular weight proteolytic hydrolases*

A 14 l. Brunswick Fermentor was charged with 10 l. of a nutrient broth composed of 5 g Bacto Peptone, 3 g yeast extract powder and 1 g beta-D-glucose per liter of broth (tap water).

The pH was adjusted to 8.0. It was then inoculated with 240 ml of a shake flask culture of a strain of *Bac. cereus*, which had formed a pronounced halo on an insoluble brain fraction suspension in 1.5 % agar when tested as described above. Fermentation was carried out at 33°C with agitation at 350 rpm and an airflow at 2000 ml/min., 5 ml of 5 % "Alkaterge C" solution in corn oil was used to suppress foaming. After 76 hours, the bacteria were separated with a Sharples super-centrifuge. The cell-free solution was subjected to ultrafiltration on an Amicon PM-10 membrane, which provides a barrier for molecules nominally larger than mol. wt. 10,000 (mfd. by Amicon Corp., Lexington, Mass.). The filter was checked with horse heart Cytochrome *n.c.* (MW - 12,400) after this filtration, thus confirming that the filter remained in good condition during the operation.

The resultant cell free solution was checked for protease activity by the Congocoll assay method of Nelson, Ciaccio and Hess(10) in a slightly modified form: pulverized Congocoll hide powder dyed with Congo Red was screened through an 80 mesh sieve to eliminate coarser lumps. 20 mg of this fine powder was added to 1/2 ml of the ultrafiltrate, together with 1/2 ml of a 0.10 molar solution of tris (hydroxymethyl) aminomethane adjusted to pH 7.2 with hydrochloric acid. It was then digested 1/2 hour at 34°C with shaking. The material was then filtered clear, and the filtrate absorbance at 495 nm determined. This ultrafiltrate showed  $A_{495} = 0.87/\text{ml}$ . A control test was made with the same ultrafiltrate after immersion in boiling water for 5 minutes. This showed a value of  $A_{495} = 0.02/\text{ml}$ ., showing substantial inactivation by rapid heating to the boiling point. This confirms that the effect measured was indeed enzymatic.

An additional 10 ml of ultrafiltrate having nominal mol. wt. between 1,000 and 10,000 showed an initial activity of  $A_{495} = 7.5/\text{ml}$  indicative of the concentration effected by removal of considerable water by ultrafiltration through the second membrane. Surprisingly, on standing at room temperature this activity increased slightly:

$A_{495}/\text{ml}$	0 day	1 day	4 days	5 days	6 days
	7.5	8.5	8.4	14.8	10.8

This effect has been noted several times. It has not yet been established whether it is due to release of an activator, removal of an inactivator, or to formation of active material by combination of components. It also appears possible that the enzymes may be initially formed as large molecules and that

some of these are auto - digested giving rise to fragments which retain enzymically active groups in molecules much smaller

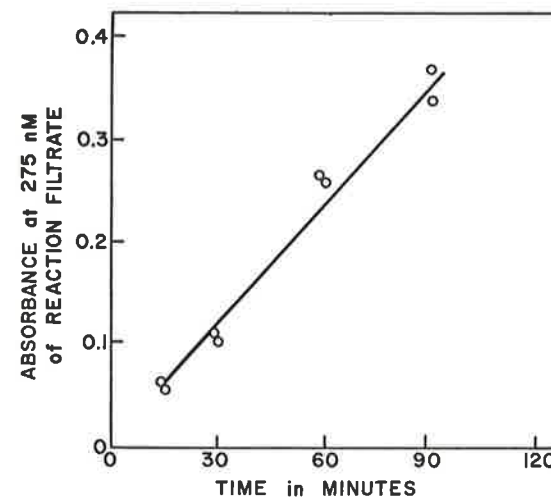


Fig. 1. Caseinolytic assay of Ultrafiltrate of nominal mol. wt. 1000-10,000, from organism 17.

than the original, and that these can then penetrate further into the aggregate, giving rise to still smaller active enzyme molecules until finally activity begins to decline.

Another halo-forming organism, "14", showed a similar increase of activity over the initial. This organism has not yet been taxonomically identified. It is air borne, showed in Czapek-Dox nutrient solution a white translucent growth with occasional white, cottony aerial hyphae. On potato culture it developed a viscid, slimy mucous sticky tan layer over the surface. This organism was grown in submerged fermenter culture, under the following conditions.

Broth: 12 000 ml containing per liter 2.0 g  $K_2HPO_4$ , 1.0 g  $H_3PO_4$ , 0.20 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 7 g casein, tap water to make 1 liter.

Starting pH	7.1
Temperature	34°C
Agitation	400 rpm
Air flow	2000 ml/min.
Antifoam added	50 ml total, Alkaterge C 5 % in corn oil
Time	137 hours
Final pH	8.1

After centrifugal separation of the cell mass, ultrafiltration was carried out (PM-10 filter) the membrane was checked with Cytochrome n.c. to make certain it was undamaged, and the proteolytic activity determined as above with Congocoll.

The ultrafiltrate through Amicon filter passing molecules nominally smaller than 10,000 mol. wt. showed the following proteolytic activities:

	<i>Initial</i>	<i>42 hours</i>	<i>119 hours;</i>
$A_{495}/\text{ml}$	0.22	2.44	0.59

Here is seen another example of an apparent increase in protease activity on standing, followed by a decline.

*Separation of low molecular weight enzymes by dialysis*

Four different organisms, "8", "12", "13", and "14" were grown in 250 ml shake flasks, using Peoria Broth until abundant growth had been established. The broths were Seitz filtered separately (not ultrafiltered). The cell-free filtrates were then combined and kept 3 days at room temperature to permit interaction.

They were then dialyzed in a tube of regenerated cellulose which did not pass hen eggwhite lysozyme (M.W. = 14,400), so that a bag containing 5 ml of sterile, enzyme-free Peoria Broth was inserted in the flask, and shaking continued 3 days.

The exterior fluid gave, in a few minutes, the characteristic deep orange with Congocoll. The sample from the inner bag similarly tested released after 30 min. incubation a faint color from the Congocoll. At the end of 24 hours this color had deepened until it almost equalled that on the undialyzed side. The bag was then re-tested with lysozyme in acetate buffer at pH 4.5 and found impermeable to this enzyme.

The findings of enzyme dialysis under these conditions were confirmed with two specimens of regenerated cellulose tubing. Both gave the same positive results using the crude enzyme mixture stated above: all four Seitz filtrates incubated together, also all possible combinations of three of these, and further with six of the possible nine combinations of two-at-a-time. In all cases the same dialysis tubes were used with lysozyme with no evidence of porosity to that molecule, also subcultures confirmed the sterility of the diffusate.

The use of ultrafiltration proved more convenient as well as more dependable and rugged for separation of enzymes having smaller molecules than those previously known - therefore in subsequent preparation work main reliance was placed on ultrafiltration.

*Casein hydrolysis assay*

In order not to depend wholly on the collagenolytic assay methods, we also applied the method of casein hydrolysis.

The casein assays were made by Hagihara's modification of the Anson and Kunitz casein hydrolysis method(12). We employed for this the low molecularweight enzyme solution obtained by ultrafiltration of the fermentor broth obtained as described above, through "Diaflo" membranes PM10 and UM2 respectively, thus taking the cut between nominal molecular weights 1,000 and 10,000. A linear rate of production of trichloroacetic acid soluble digestion products was found, as shown in Figure 1.

Ultrafiltrate from Organism 17 nominal mol. wt. between 1,000 and 10,000

	Casein Method 30 min. incubation $A_{275}/\text{ml}$	Congocoll Method 30 min. incubation $A_{495}/\text{ml}$
Ultrafiltration fraction 1000 - 10 000	1.00	5.86
Ultrafiltrate before con- centration on UM2 membrane	0.27	1.80

*Assays with tritiated insoluble protein residue*

To prepare the tritiated assay substrate, a pregnant Sprague-Dawley rat was given orally in her drinking water 8 millicuries of tritiated tyrosin as follows: 2 mc seven days before parturition, 2 mc daily the first and second days, and 1 mc daily the fifth and sixth days following parturition. The litter born thus received tritium through the body of their mother, either in the last days of her pregnancy, or during lactation. They never received any other radioactive material than this.

A male rat from this litter died of pneumonia at age 480 days. The muscles were removed as completely as possible, combined, and all matter that could be dissolved or enzymatically hydrolysed using commercially available enzymes, was removed. Some of the tritium administered at birth still remained in the insoluble residue. This tritium is assumed to be in structures resistant to attack by the catabolic enzymes of the rat.

The muscle tissue separated as above was homogenized in a Virtis disintegrator, extracted exhaustively with water, precipitated after extracting with 10 times its volume of acetone, the precipitate extracted 24 hours by the Soxhlet method using as solvent a mixture of chloroform and methanol (2:1) so that

water solubles, fats and phospholipids were effectively removed. The residue was then dried and re-pulverized, and the extraction resumed for an additional 5 hours.

After drying the residue was then hydrolysed with "Pronase". 1.20 g (air dried) of rat muscle residue was digested with 60 mg of "Pronase" at 35°C for 68 hours. Every 12 hours pH was re-adjusted to pH 9 and an additional 30 mg of the enzyme added. After 68 hours the digestion appeared complete in that radioactivity in the supernatant fluid showed no further increase.

This residue was washed thoroughly on the centrifuge, to remove remaining enzyme, dried and pulverized. A 20 mg sample was combusted in oxygen according to the Thomas-Ogg method (14). The resultant water, which contained all the tritium in the sample, was added to a scintillation counting liquid, 1/2 ml to 15 ml of "cocktail", and the radioactivity was determined on a Beckman 1000 scintillation counter. 440 CPM were found in the 20 mg sample.

50 mg of the above described tritiated protein residue, already exhaustively hydrolyzed by "Pronase" was digested with 2 ml of ultrafiltrate from a strain of *Bac. cereus*. The 50 mg of tritiated insoluble residue contained a tritium activity of 1,100 cpm. An aliquot of supernatant was removed and counted at the time intervals shown below. After the 47 hour sample had been taken, a fresh 3 ml of the enzyme ultrafiltrate was added, and the digestion continued. The progressive liberation of previously very firmly bound radioactivity is apparent from the following table.

	Digestion Time					
	1 hr	6 hrs.	23 hrs.	47 hrs.	70 hrs.	143 hrs.
	Fresh enzyme ultrafiltrate added, new count started					
CPM per ml	28	46	168	606	40	66
CPM for total supernatant	56	69	168	606	120	165

It is thus seen that this low molecular weight enzyme was capable of dissolving over half of the radioactivity fixed in insoluble residues from the animal and not liberated by exhaustive "Pronase" digestion.

In order to determine whether the radioactivity liberated was really dissolved in the water phase, and not merely suspended in the colloidal state, it was subjected to ultracentrifugation for 2 hours at 50,000 g. There was no sedimentation of radioactivity and no visible sign of sedimentation.

To check the molecular weight with a somewhat different procedure and a low molecular weight enzyme prepared from a different organism, we proceeded as follows: A cell-free fermentor broth of a mutant strain of *Bac. cereus*, which had a Congocoll assay value of  $A_{495} = 30/\text{ml}$ , purified by presipitations and ultrafiltrations so as to obtain an enzyme concentrate which had an activity at its optimum, pH 7.2, of 320  $A_{495}/\text{ml}$ .

We applied the method of Whitaker (11) for molecular weight determination for globular proteins. The freshly prepared

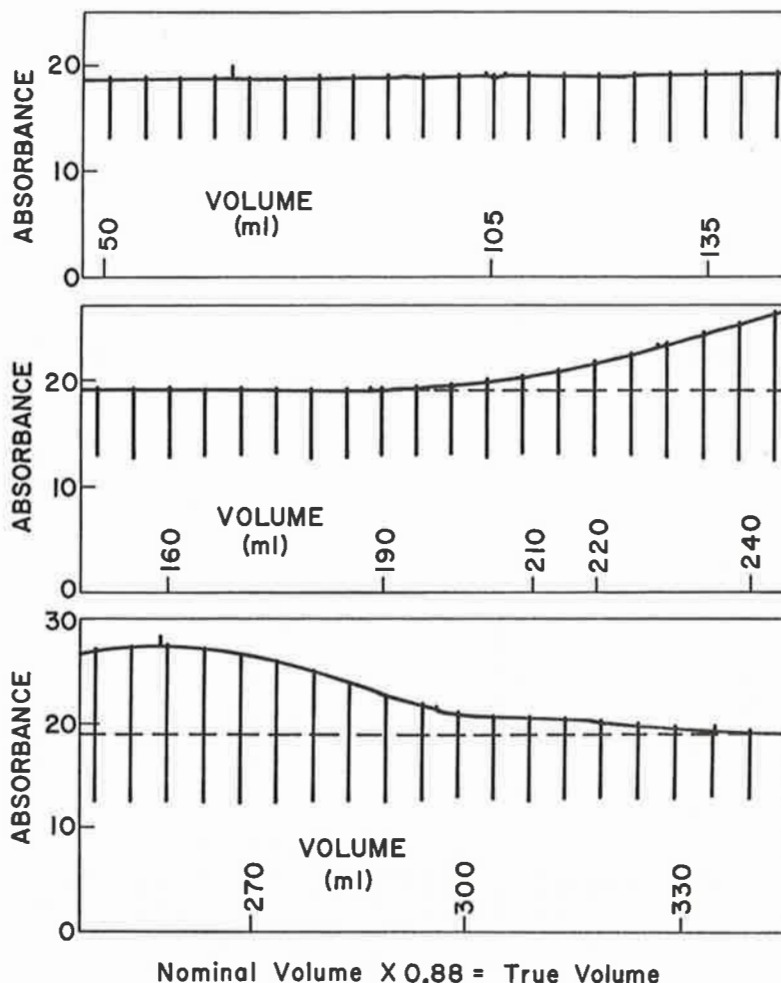


Fig. 2. Enzyme preparation Congocoll activity 320/ml, filtered twice through Amicon filter nominally holding back mol. wts. above 10,000. Passage through Biogel-P10 column.

ultrafiltrate was passed twice through Amicon filters with nominal cutoff at 10,000 mol.wt., and then concentrated by ultrafiltering through Amicon filters with nominal cutoff at 1,000. This material showed an activity of  $A_{495} = 320/\text{ml}$  by the Congocoll method. A chromatographic column  $2.2 \times 70$  cm was packed with "Biogel P-10", 200-400 mesh (a crosslinked polyacrylamide gel with resolving power over the molecular weight range 1,500 to 20,000). The gel had been washed free of fines and equilibrated 24 hours with 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.1. Samples were applied in a 1.0 ml volume and the column operated at room temperature at a flow rate of 50 ml/hr. The effluent absorbance at 280 nm was recorded continuously and 5.0 ml fractions were collected. The results of several successive (calibration and sample) runs on the same column are tabulated below. Figures 2 and 3 show the experimental records of absorbance vs. effluent volume for runs 3 and 5 respectively.

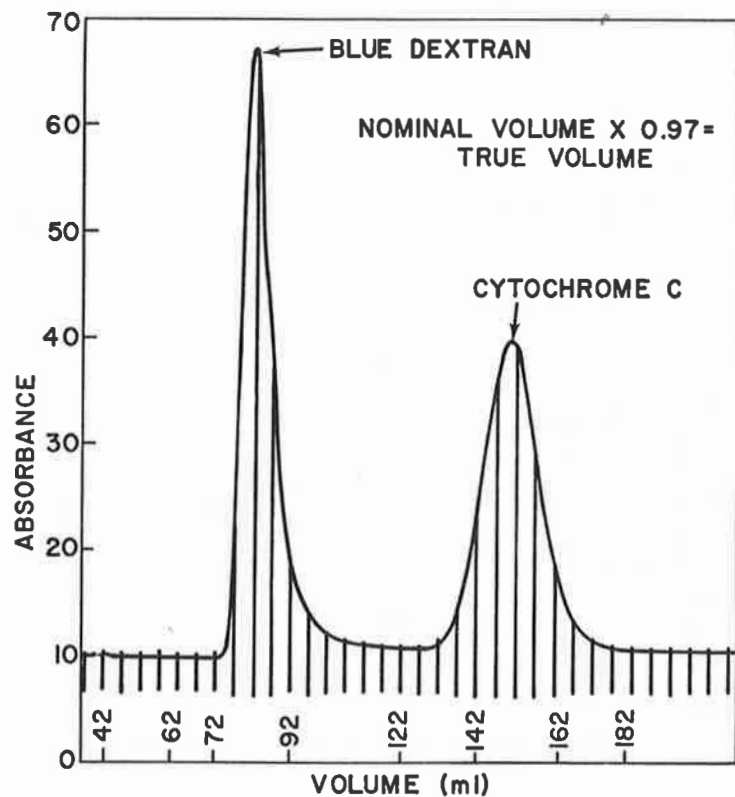


Fig. 3. Calibration (in part) for column of Fig. 2.

No. of runs in actual sequence	Blue Dextran M = $2 \times 10^6$	Cytochrome c M = 12,400	Pancreatic Trypsin Inhibitor, M = 6,500	<i>Bac. cereus</i> Ultrafiltrate Conc.
1	15 mg; 76 ml	.....	.....	.....
2	.....	6 mg; 148 ml	11 mg; 211 ml $\pm 5$ ml	.....
3	.....	.....	.....	10 mg; 238 ml
4	0.7 mg; 78 ml	.....	.....	$\pm 5$ ml
5	3.2 mg; 76 ml	7 mg; 143 ml	6.5 mg; 235 $\pm 10$ ml.	.....

From the above data a linear plot was constructed relating  $V/V_0$  to  $\log_{10} M$ , where  $V$  is the elution volume at the peak of a component,  $V_0$  is the void volume (determined with blue dextran), and  $M$  is the molecular weight of a component. This plot is shown in Figure 4 with the region of uncertainty lying between the two lines. These results yield a molecular weight of between 6,700 and 4,600, or a mean probable weight of  $5,700 \pm 20\%$ . The passage of the material through the column is accompanied by inactivation, possibly by separation of a cofactor, or by change of extent of polymerization of the enzyme.

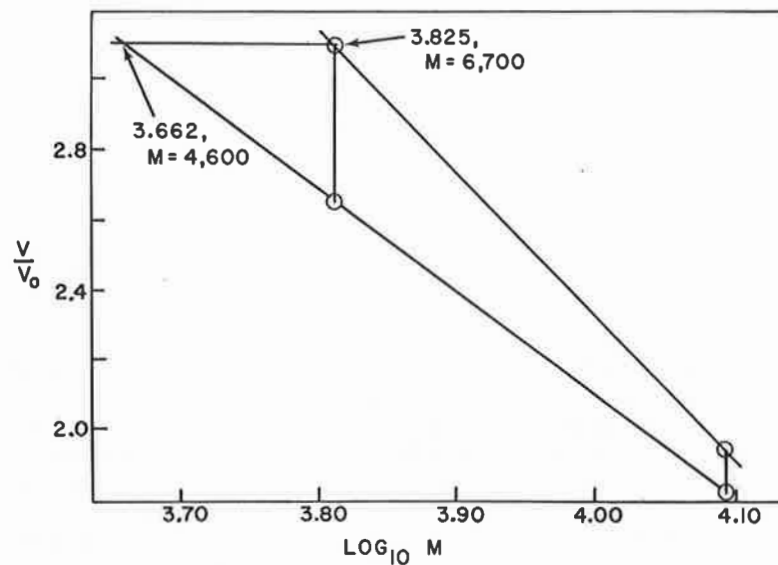


Fig. 4. Whitaker plot for mol. wt. range estimation from data of Fig. 2 and 3.

*Characterization of three proteases of molecular weight <10,000 with respect to inhibitors and activators*

The assay procedure used was the Congocoll method described above. The table below shows additions made, and activities obtained expressed as percent of the control assays on the ultrafiltrates.

Partially purified protease of mol. wt. less than 10,000	Standard assay + cysteine $1.7 \times 10^{-3}M$	Standard assay + $CaCl_2$ $7 \times 10^{-3}M$	Standard assay + phenyl methyl sulfonyl fluoride $1.6 \times 10^{-4}M$	Standard assay + p hydroxy mercuri benzoate, $3.2 \times 10^{-4}M$	Standard assay + EDTA $1.0 \times 10^{-3}M$	Standard assay solution	Enzyme solution heated 5 min. at $100^\circ$ , before assay
Organism 8 Ultrafiltrate	55 % (80 % when re-checked)*	92 %	88 %	160 % (173 % when re-checked)	31 %	100 %	0 %
Organism 12 Ultrafiltrate	27 % (72 % when re-checked)*	57 %**	100 %	101 %	9 %	100 %	0 %
Organism 13 Ultrafiltrate	108 %	132 %	95 %	126 %	97 %	100 %	0 %

\* Some oxidation (formation of insoluble cystine) occurred in the cysteine stocksolution overnight - this may account for the observed lessened inhibition.

\*\* This contained a fine precipitate, probably insoluble calcium phosphate, since a substantial concentration of inorganic phosphate is present in the B-broth growth media.

The results shown in the above Table show patterns of response to potential inhibitors and activators that are typical of proteolytic enzymes. They also show that the three enzymes examined are all distinctly different from one another. This can be seen more easily in the following abbreviated summary of the agents that affect each enzyme. The code for effects is (---), strong inhibition; (--), definite inhibition; (-), weak inhibition; (+++), strong activation; (++) , definite activation; (+), weak activation; (0), no effect.  
*Organism 8 Ultrafiltrate MW 10,000*

Boil (---), cysteine (--), pHMB (++), EDTA (---)

*Organism 12 Ultrafiltrate MW 10,000*

Boil (---), cysteine (--), pHMB (0). EDTA (---)

*Organism 13 Ultrafiltrate MW 10,000*

Boil (---), cysteine (0), pHMB (+), EDTA (0)

All of the low molecular enzymes so far observed were optimally active in the pH range 6.5 to 8.0.

*Variability of enzyme content between strains of Bac. cereus*

Cultures of several strains of *Bac. cereus* were grown in shake flasks 24 and 48 hours, under simulation of the conditions used in low molecular weight protease fermentor run. The variability both of total enzyme content, and of the ratio of low molecular weight protease to total protease, is apparent in the following table.

Congocoll assay of the ultrafiltrates mol. wt. below 10,000  
 $A_{495}$  values by Congocoll method

Shake flask incubation time:	24 hrs		48 hrs.	
	Crude broth	Ultrafiltrate mol. wt. below 10,000	Crude Broth	Ultrafiltrate
Strain No. 1	0	0.04	0.01	
2	7.0	2.92	9.8	0.42
3	0.12	0.08	0.08	
4	0	0	0.03	
5	3.0	0.66	1.7	0.10
6	1.26	0.14	0.18	
7	1.36	0.46=	1.0	0.09
8	9.9	1.9	22.6	2.6

*Discussion*

The low molecular weight proteases now found in three defined and a considerable number of taxonomically still undefined organisms may provide at least a partial explanation for the well known ability of many microorganisms to attack substrates which are resistant to generally recognized enzymes. This is particularly true of highly crosslinked aggregates. It is well recognized that crosslinkages provide severe steric hindrances. This is basic for the leather industry, the rubber industry and a large segment of polymer industry, and appears to be a significant factor in the basic chemistry of aging. Smaller enzyme molecules can obviously penetrate where larger molecules are sterically hindered.

The fact that we have already established differences between at least three protein hydrolases in the molecular weight range substantially below 10,000 indicates that we may be dealing with a large family of enzymes previously unrecognized because of their limited stability, their tendency to polymerize, and because they are usually accompanied by larger molecular weight enzymes of similar activity from which they must be separated to be recognized.

It appears probable that this observation will be found to apply to many other classes of enzymes, including lipases, amylases, nucleases, and others.

The hydrolytic enzymes here reported are viewed as early representatives of a family of substances. It may be appropriate to call these *gerolytic* enzymes. It would be fortuitous indeed if the present examples were not soon superseded by still more effective and more easily prepared members of the same broad class of enzymes. We will direct our search toward enzymes characterized mainly by molecular weights low enough to penetrate cage structures, and compatibility with living systems. The enzymes in hand are being studied further as they represent the best means now apparent to act upon gerogenic insolubles under physiological conditions.

#### Acknowledgment

The authors express their appreciation to The Upjohn Company for permission to publish findings from an industrial investigation. They are indebted to Dr. Richard S. Schreiber, Dr. J. E. Gray, Dr. R. C. Thomas, Dr. G. B. Whitfield, Dr. Fritz Reusser and Dr. C. L. Graham of The Upjohn Company; to Dr. David E. Green of the University of Wisconsin, and Dr. Donald Wetlaufer of the University of Minnesota for valuable advice; to Dr. Roy U. Schenk, Mr. Ralph W. Buetow, Mrs. Harriet Song, Dr. Stephanie Richards, Mrs. Marce Anderson, and Mr. Edward Rock for experimental contributions.

#### Bibliography

1. Bjorksten, J.: Chemistry of Duplication, *Chem. Industries* 50: 69 (Jan.) 1942.
2. Bjorksten, J.: Approaches and Prospects for the Control of Age-Dependent Deterioration in *Annals of New York Academy of Sciences* 184: 95-102 (June) 1971.
3. Andrews, F. A., Bjorksten, J., Underwood, C., Thomson, D. and Laakso, P.: Chemical Composition of Enzyme-Fractionated Aged Heart Tissue, *J. Am. Geriatrics soc.* 13: 94-101 (Feb.) 1965.
4. Bjorksten, J., Andrews, F. A. and Prahl, H. F.: Anhydrous Hydrogen Fluoride as a Tool in Studying Cross-linkages in Proteinaceous Substances Accumulating with Age, *Finska Kemists. Medd.* 71: 69-76, 1962.

5. Fischer, E. and Schrader, H.: Verbindungen von Chinon mit Aminosäureestern, *Berichte d. d. Chem. Ges.* 43: 525, 1910.
6. Ciferri, A. and Rajagh, L. V.: The Aging of Connective Tissue, *J. Gerontology* 19: 220-224 (Apr.) 1964
7. Ciferri, A., Rajagh, L. V. and Puett, D.: Interaction Between Proteins and Salt Solutions III, *Biopolymers* 3: 461-480, 1965.
8. Zinsser, H., Bjorksten, J., Bruck, E. M., Baker, R. F., Kaeburn, L., Kinnear, J., Cohen, A., Andrews, F., Sarfati, I. and Light, I.: The Freezing Pool: A Unified Sequence of the Aging Process, in *Medical and Clinical Aspects of Aging*, ed. by Blumenthal. From Proc. 5th Congress of the International Assoc. of Gerontology, 1962. New York and London, Columbia University Press, 1962, pp. 460-483.
9. Zinsser, H. H., Butt, E. M., and Leonard, J.: Metal Content Correlation in Aging Aorta, *J. Am. Geriatrics soc.* 5: 20-26 (Jan.) 1957.
10. Nelson, W. L., Ciaccio, E. I. and Hess, G. P.: A Rapid Method for the Quantitative Assay of Proteolytic Enzymes, *Anal. Biochem.* 2: 39-44, 1961.
11. Whitaker, J. R.: Determination of Molecular Weights of Protein by Gel filtration on Sephadex, *Anal. Chemistry* 35: 1950-1953, 1963.
12. Hagihara, B.: Crystalline Bacterial Proteinase: I. Preparation of Crystalline Proteinase of *Bac. Subtilis*, *J. Biochem. (Tokyo)* 45 No. 3: 185, 1958.
13. Cocking, E. C. and Yemm, E. W.: Estimation of Amino Acids by Ninhydrin, *Proc. of Biochem. Soc. in Biochemical Journal* 58: xii, 1954.
14. Ogg, C. L.: Proc. International Symposium on Microchemical Techniques. *Microchem. J.*, Symposium Series, Vol. 2, New York, Interscience 1961.

## Innehåll 1971 Sisältö

Terje Enkvist, Anja Andersen and Heikki Nupponen: Preliminary Experiments with Preparation of Alkydes from Components Obtained from Spent Kraft Liquors by Heating with Alkali .....	2
Johan-Fredrik Selin and Veronica Sundman: Microbial Action on Lignosulfonates .....	11
Litteratur .....	20
Johan Björksten: The Crosslinkage theory of aging ..	23
Rainer Ekman and Göran Pensar: Studies on Components in Wood .....	40
Franciska Sundholm: On the Syntheses of Some Nitronylnitroxide and Iminonitroxide Free Radicals <sup>r</sup> .....	48
Centralrådets för Finlands Kemister verksamhetsberättelse för år 1970 .....	52
Litteratur .....	53
Omorganisation av de kemiska tidskrifterna i Finland .....	54
Terje Enkvist: Ernst Qvist och Edvard Hjelt, glimtar av två av samfundets stiftare .....	56
H. B. Wiik: Om månstenarnas kemiska sammansättning ..	68
Johan Björksten, Elliott R. Weyer and Stephen M. Ashman: Study of Low Molecular Weight Proteolytic Enzymes .....	70



## Oy KESKUSLABORATORIO CENTRALLABORATORIUM Ab

Massa- ja paperialan erikois-  
tutkimuksia

Kemiallisia analyysejä

Vesitutkimuksia

Kirjallisuuspalvelu

os. Postilokero 10136  
00100 Helsinki 10  
puh. 460411

Specialundersökningar på mas-  
sa- och pappersområdet

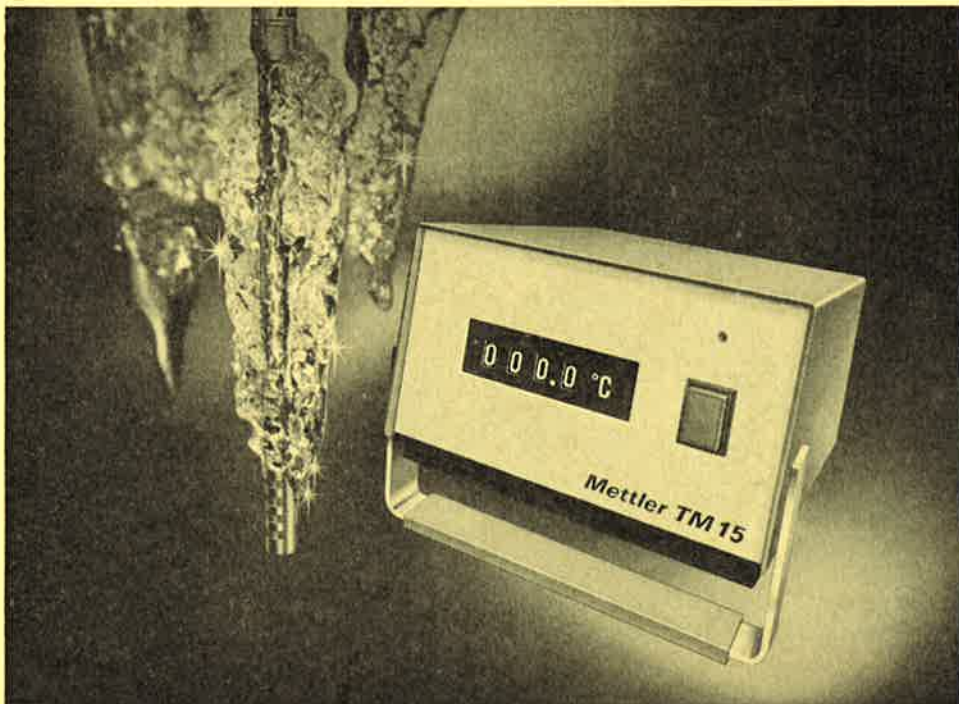
Kemiska analyser

Vattenundersökningar

Litteraturtjänst

adr. Postbox 10136  
00100 Helsingfors 10  
tel. 460411

**The accurate ones from Mettler. They do more than just measure temperature.**



When you know that Mettler platinum resistance digital thermometers, models TM15 and TM16, are used to calibrate other precision temperature measuring devices, that says something about their accuracy.

Mettler TM digital thermometers use interchangeable platinum resistance temperature sensors renowned for long-term stability and accuracy. Their sensitivity to small temperature changes suits them ideally for measuring and controlling temperatures over very narrow ranges. Read digitally to the tenth of a degree from  $-20$  to  $+300^{\circ}\text{C}$ , or  $-4$  to  $+575^{\circ}\text{F}$  continuous, without the

need to switch ranges. Or use the built-in linear recorder output to make a continuous record.

The Mettler TMs are used typically to measure liquid baths, gas processes, distillation processes, time-temperature recordings, as well as for boiling points and materials testing. They're both fast, easy to use, and portable. There are eight different sensors available, even one to measure surface temperature.

These are truly the accurate ones. The reliable ones. For additional information, please write.

*Mettler*

ADVANCING THE TECHNOLOGY OF MEASUREMENT



**G.W. BERG & CO**

Helsingfors 13, Tel. 11541  
Fabiansg. 14  
Telex 12885

Mettler Instrumente AG  
CH-8606 Greifensee-Zürich  
Switzerland