

## LA COMPOSITION DU LYSOZYME EN ACIDES AMINÉS

I. ACIDES AROMATIQUES,  
ACIDES DICARBOXYLIQUES ET BASES HEXONIQUES

par

CLAUDE FROMAGEOT ET MICHEL PRIVAT DE GARILHE

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences (Paris)*

La possibilité d'obtenir du lysozyme cristallisé à l'état pur<sup>1, 2</sup> et d'en contrôler l'activité biologique<sup>3, 4</sup>, le caractère enzymatique de cette substance et son poids moléculaire relativement faible, rendent particulièrement intéressant son choix comme matériel pour l'étude de la structure d'une protéine.

L'étude de cette structure nécessite la connaissance préalable, aussi exacte que possible, de la teneur en Azote total, en Soufre et éventuellement en Phosphore, et de la composition en acides aminés de la protéine en question. Or, parce que les Auteurs qui se sont attachés à l'étude analytique du lysozyme n'ont eu jusqu'ici entre les mains qu'une substance beaucoup moins pure qu'ils ne pensaient, et utilisaient des procédés analytiques parfois défectueux, les rares indications concernant le lysozyme, que l'on trouve actuellement dans la bibliographie sont, comme on le verra plus loin, souvent en désaccord les unes avec les autres. Aussi nous attachons-nous, dans le présent travail, à donner une première série de résultats concernant la composition et la teneur en divers acides aminés du lysozyme pur. Nous avons étudié à ce point de vue plusieurs échantillons de lysozyme ; les uns ont été préparés par nous-mêmes, comme il est dit ci-dessous ; un autre provient de "Armour Laboratories", Chicago, Ill. D'après les indications fournies par ces laboratoires, cet échantillon a été préparé comme les nôtres, mais n'a été recristallisé que trois fois. Sa teneur en azote est donnée comme étant de 16.8 %, et son activité, mesurée d'après GOLDWORTHY ET FLOREY<sup>5</sup> sur *Micrococcus lysodeikticus*, est de 1000000 d'unités/g. Nous distinguons par un astérisque les résultats obtenus à partir de cet échantillon.

Tous les résultats analytiques sont ici calculés pour du lysozyme sec (séchage à 56°, sous 0.1 mm Hg) et sans cendre. Dans le cas des chiffres trouvés dans la littérature, et cités à titre de comparaison, ceux-ci ont été recalculés, lorsqu'il a été nécessaire, de telle sorte qu'ils correspondent également à la protéine sèche et sans cendre.

## PRÉPARATION DU LYSOZYME

Le lysozyme est préparé à partir du blanc d'œuf selon la méthode de ALDERTON ET FEVOLD<sup>2</sup>. Le produit cristallisé obtenu directement au sein du blanc d'œuf par alcalinisation de ce dernier à pH 9.5, suivie de l'addition de 5 % de chlorure de sodium et maintien à 4° pendant 4 à 5 jours, contient au plus 40 à 50 % de lysozyme. On recueille ce produit cristallisé par centrifugation, on le lave

*Bibliographie p. 90/91.*

à deux reprises par une solution de chlorure de sodium à 5 % ajustée à pH 9.5 par addition de soude. On en extrait le lysozyme en dissolvant celui-ci par une solution diluée d'acide acétique, de pH 4.6 à 5.6. On centrifuge pour éliminer les parties non solubles qu'on lave deux fois à l'acide acétique dilué. On réunit les solutions acétiques dont le volume total doit être environ le huitième de celui du blanc d'œuf initial. On recristallise une première fois le lysozyme par addition de soude jusqu'à pH 9.5 et de 5 % de chlorure de sodium, et en maintenant 5 jours à 4°, comme pour la cristallisation initiale. On récolte les cristaux, puis, après les avoir lavés par la solution alcaline de chlorure de sodium, on les redissout dans un volume d'acide acétique dilué égal environ au vingtième du blanc d'œuf initial. La solution obtenue n'est pas encore limpide; on la centrifuge, puis on la filtre, toujours en la maintenant à 4°. À la solution alors limpide, on ajoute 5 % de bicarbonate de sodium. Le lysozyme précipite, d'abord amorphe, puis il cristallise. On achève la purification par dissolutions dans l'acide acétique et précipitations par le bicarbonate, répétées encore quatre fois, en filtrant éventuellement les premières solutions acétiques. Les deux dernières doivent rester limpides. A partir de 150 œufs de taille moyenne, on obtient ainsi finalement environ 3 g d'un produit parfaitement cristallisé en prismes allongés<sup>3</sup> se dissolvant instantanément dans l'acide acétique dilué en donnant une solution parfaitement limpide. Son activité biologique, mesurée par son action lysante vis-à-vis de *Micrococcus lysodeikticus*, selon la technique de BOASSON<sup>3</sup>, et comparée à celle du blanc d'œuf dilué pris comme étalon, est égale à celle indiquée par ALDERTON *et col.*<sup>1</sup> pour le lysozyme électrophorétiquement pur. En outre, sa composition en acides aminés ne varie plus à partir de la quatrième recristallisation; cette remarque est particulièrement importante en ce qui concerne le tryptophane, beaucoup plus abondant que dans les autres protéines, et la méthionine qui manque au contraire complètement. Une contamination par une autre protéine, par l'ovalbumine, par exemple, dont les teneurs en tryptophane et en méthionine sont respectivement de 1.3 %<sup>6</sup> et de 5.0 %<sup>7</sup>, se manifestera par une baisse apparente de la teneur en tryptophane et la présence apparaente de méthionine dans le lysozyme.

#### DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Le dosage de l'azote total du lysozyme exige soit que l'on tienne compte des cendres correspondant aux sels toujours plus ou moins entraînés au cours de la cristallisation, soit que l'on élimine auparavant totalement ces sels. L'élimination des sels se fait par dialyse contre l'eau distillée courante. Etant donné le poids moléculaire relativement faible du lysozyme, la dialyse provoque la perte d'une certaine quantité de la substance. On arrive néanmoins à obtenir une solution pratiquement débarrassée de sels, qui, désséchée sous vide à froid, fournit du lysozyme pur, sous forme d'une poudre blanche floconneuse. Le dosage de l'azote total a été fait ici tout d'abord par micro-Kjeldahl, après 15 heures de minéralisation, en présence d'acéate mercurique comme catalyseur; on sait que la minéralisation des protéines au cours du micro-Kjeldahl reste parfois incomplète<sup>8</sup>; d'autre part, l'azote du tryptophane se montre particulièrement résistant à la minéralisation<sup>9</sup>. Or, le lysozyme contient, comme on le verra plus loin, des quantités élevées de tryptophane. Il nous a donc paru utile de confronter les résultats obtenus avec ceux fournis par le dosage de l'azote total par micro-Dumas. Les résultats obtenus correspondant à la moyenne de deux dosages, exprimés en azote total pour cent du produit sec et sans cendres, sont les suivants:

Micro-Kjeldahl: 16.6; 16.7\*; Micro-Dumas: 16.7.

Nous considérons ainsi que la teneur en azote total exprimée en pour cent du lysozyme sec et sans cendres, est égale à 16.7. C'est cette valeur que nous utilisons dans le présent travail pour ramener au lysozyme pur les résultats analytiques. Cette valeur diffère nettement de celles publiées précédemment: 15.85<sup>10</sup>; 13.3<sup>11</sup>; 16.4<sup>12</sup>.

#### ANALYSE QUALITATIVE DES ACIDES AMINÉS DU LYSOZYME

Avant de procéder à l'analyse quantitative des acides aminés constituant le lysozyme, nous avons cherché à caractériser qualitativement leur présence. L'hydrolysat  
*Bibliographie p. 90/91.*

chlorhydrique obtenu comme il est dit plus bas a été soumis à la chromatographie de partage bidimensionnelle sur papier, selon la méthode maintenant classique de CONSDEN, GORDON ET MARTIN<sup>13</sup>, en utilisant comme solvant, d'une part, du phénol, d'autre part, du butanol, tous deux additionnés de 0.1% de cupron. Les acides aminés suivants ont pu être mis nettement en évidence: glycocolle, alanine, sérine, cystine, thréonine, valine, leucine, isoleucine, tyrosine, phénylalanine, acide aspartique, acide glutamique, lysine, arginine, histidine. Manquent: le tryptophane, détruit au cours de l'hydrolyse chlorhydrique, mais dont on verra qu'il existe en forte proportion dans la molécule de lysozyme, l'hydroxyproline qui semble ne pas exister, et la proline et la méthionine, qui n'existent certainement pas.

#### DOSAGE DU TRYPTOPHANE

A une quantité comprise entre 2 et 6 mg de lysozyme, on ajoute 2 ml d'une solution de soude N contenant 35 mg de gélatine, selon les indications de GRAHAM *et col.*<sup>14</sup>, l'ensemble étant placé dans un tube scellé que l'on maintient deux heures à 110° selon HESS ET SULLIVAN<sup>15, 16</sup>. Le dosage colorimétrique du tryptophane est fait à l'aide de p-diméthylaminobenzaldéhyde, par la méthode de BATES<sup>17</sup>. Il fournit les valeurs suivantes, exprimées en tryptophane pour cent de lysozyme:

7.5; 7.4; 7.5. Moyenne: 7.47.

Valeurs publiées précédemment: 2.4<sup>18</sup>; 8.0<sup>19</sup>.

Nous confirmons ici l'observation de GRAHAM *et col.*<sup>14</sup>, à savoir que lorsque du tryptophane pur est traité par la soude en tube scellé dans les conditions que nous venons d'indiquer, l'intensité et la stabilité de la coloration produite sont nettement accrues si le traitement a lieu en présence de gélatine; il ne s'agit pas là seulement d'une protection du tryptophane contre sa destruction: en effet, l'intensité de la coloration qui se forme à partir de tryptophane traité à chaud en présence de gélatine comme il vient d'être dit, est supérieure à celle que l'on obtient à partir du mélange des mêmes quantités de tryptophane et de gélatine non soumis à la chaleur (Tableau I).

TABLEAU I

INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA CHALEUR DU MÉLANGE TRYPTOPHANE + GÉLATINE SUR LA COLORATION FOURNIE PAR LE TRYPTOPHANE DANS LA MÉTHODE DE BATES<sup>17</sup>

o.1 ml d'une solution aqueuse contenant 520 µg de tryptophane sont ajoutés à 2 ml d'une solution de soude N contenant 2.5% de gélatine.

A = Soumis à 110° en tube scellé pendant 2 heures.

B = Non traité.

D = Densité optique mesurée pour  $\lambda = 600 \text{ m}\mu$ , sous 1 cm.

| Solution | D     |       |
|----------|-------|-------|
|          | I     | II    |
| A        | 0.768 | 0.787 |
| B        | 0.690 | 0.714 |

Il est donc essentiel, comme le recommandent GRAHAM *et col.*<sup>14</sup>, de préparer un tube témoin constitué par du tryptophane pur et de la gélatine.

*Bibliographie p. 90/91.*

D'autre part, Y. MOULÉ nous a aimablement communiqué les résultats de dosages de tryptophane exécutés selon la méthode de VOISENET<sup>20</sup> portant sur le lysozyme, provenant de Armour Laboratories, soit avant toute hydrolyse: 7.64 %\*, soit après hydrolyse alcaline: 7.83 %\*. Ces résultats, obtenus par une méthode analytique autre que celle que nous avons utilisée ici, confirment les nôtres d'une façon satisfaisante.

#### DOSAGE DE LA TYROSINE

Le dosage de la tyrosine est fait soit sur des hydrolysats alcalins, soit sur des hydrolysats acides du lysozyme.

*Dosage sur hydrolysats alcalins.* Une quantité voisine de 100 mg de lysozyme est traitée en tube scellé par 2 ml de soude 5 N pendant 18 heures à 110°. L'hydrolysat obtenu est ensuite soumis à l'analyse d'après FOLIN ET MARENZI<sup>21</sup>. Les résultats, exprimés en tyrosine pour cent de lysozyme sont les suivants:

3.85; 3.81; moyenne: 3.83.

Valeur publiée précédemment: 4.9<sup>18</sup>.

FRAENKEL-CONRAT *et col.*<sup>19</sup> ont indiqué une valeur chromogène maxima de 12.4%, calculée en tryptophane, correspondant au dosage, par le réactif de FOLIN, d'après HERRIOT<sup>22</sup> de l'ensemble tyrosine + tryptophane sur le lysozyme hydrolysé par la pepsine, après dénaturation par la chaleur en milieu acide. Exprimant en tryptophane la valeur de 3.83 ci-dessus, soit 4.32 et l'ajoutant à la valeur de 7.47 obtenue pour le tryptophane, on trouve pour la somme tyrosine + tryptophane, exprimée en tryptophane, 11.79%; cette dernière valeur ne diffère que de 5% de celle que FRAENKEL-CONRAT *et col.* ont mesurée directement. L'accord est satisfaisant entre ces deux déterminations faites par des voies différentes.

*Dosage sur hydrolysats acides.* Des dosages de tyrosine ont été exécutés sur la fraction "aromatique" des hydrolysats acides obtenus comme il est dit plus bas, par colorimétrie comme dans le cas des hydrolysats alcalins. Les résultats, exprimés en tyrosine pour cent de lysozyme, sont les suivants:

3.30; 3.17; 3.67. Moyenne: 3.38.

Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux que l'on trouve après hydrolyse alcaline. Cette infériorité est l'indice d'une destruction sensible de la tyrosine. Si celle-ci paraît en effet résister à toute destruction par les acides à chaud en l'absence de tryptophane ou en présence de faibles quantités de cet acide aminé<sup>23</sup>, elle est au contraire entraînée vers une destruction partielle, de l'ordre de 10 à 20%, quand elle se trouve, comme ici, en présence d'une quantité importante de tryptophane. Aussi est-ce seulement aux valeurs de tyrosine obtenues après hydrolyse alcaline que nous attribuons une signification précise.

#### DOSAGE DES BASES HEXONIQUES ET DES ACIDES DICARBOXYLIQUES

100 mg environ de lysozyme sont traités, en tube scellé, par 3 ml d'acide chlorhydrique 5.5 N à 110° pendant 24 heures. Le liquide obtenu est évaporé à sec, sous vide, à la température ordinaire, en présence d'acide sulfurique, d'anhydride phosphorique et de potasse en pastilles. Le résidu est repris par l'eau distillée, celle-ci est évaporée, cette opération étant répétée encore deux fois. Le résidu est repris par l'eau et légèrement alcalinisé (jusqu'à teinte nettement rose de la phénolphthaléine) par addition de lithine N (environ 1.5 ml). L'ammoniac déplacé est entraîné sous vide par la vapeur d'eau, recueilli et dosé. Les résultats exprimés en mg d'azote pour 100 mg de lysozyme sont les suivants:

1.69; 1.63; 1.71; 1.69. Moyenne: 1.68.

On sait que cet ammoniac correspond pour la majeure partie à l'azote des groupements amidés, et pour une part beaucoup plus faible, à la décomposition du tryptophane et de certains acides aminés tels que la sérine et la thréonine.

La solution débarrassée d'ammoniac est soumise à la série successive des chromatographies telles qu'elles sont décrites par FROMAGEOT, JUTIZZ ET LEDERER<sup>24</sup>, dans l'ordre: adsorption sur silice, adsorption sur charbon et adsorption sur alumine. On obtient ainsi les fractions correspondant à chacun des éluats: bases hexoniques, acides aminés dicarboxyliques, acides aminés aromatiques, puis au filtrat final: acides aminés neutres autres que les dérivés aromatiques. Nous n'étudions ici que les acides aminés des trois premières fractions.

#### BASES HEXONIQUES

La chromatographie de partage sur papier d'une gouttelette prélevée sur la fraction éluée de la silice, après concentration sous vide, montre que seules les bases hexoniques sont présentes dans cette fraction. Leur séparation est donc bien spécifique.

L'azote total de l'ensemble des bases hexoniques correspondant à 100 mg de lysozyme, est, en mg:

5.54; 5.61; 5.58. Moyenne: 5.58.

Le dosage de l'*histidine* se fait par la méthode de PAULI, selon la technique de MCPHERSON<sup>25</sup>. Etant donnée la faible proportion de l'*histidine* par rapport à l'*arginine* présente, il était nécessaire de vérifier que cette dernière ne gêne pas le dosage colorimétrique de l'*histidine*. Il en est bien ainsi. Les valeurs trouvées pour l'*histidine*, exprimées en base libre pour 100 de lysozyme, sont les suivantes:

0.97; 0.91; 1.02; 0.91. Moyenne: 0.95.

Il était indispensable de savoir si une destruction notable de l'*histidine* n'avait pas lieu au cours de l'hydrolyse. Nous avons donc traité par l'acide chlorhydrique dans les conditions décrites plus haut, un mélange des trois bases hexoniques et de tryptophane, dans des proportions voisines de celles où ces acides aminés existent dans le lysozyme. Après élimination et dosage de l'ammoniac formé, la solution a été soumise à une chromatographie sur silice, suivie d'une élution. L'*arginine* et l'*histidine* ont été dosées dans l'éluat. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau II.

TABLEAU II

DESTRUCTION PARTIELLE DE L'HISTIDINE PAR CHAUFFAGE EN MILIEU ACIDE EN PRÉSENCE DE TRYPTOPHANE

| Composition du mélange en acides aminés (mg) | Azote (mg) | Retrouvé par dosage | Perte % |
|----------------------------------------------|------------|---------------------|---------|
| Arginine base 12.00 . . . . .                | 3.86       | 12.20               | 0       |
| Histidine base 0.89 . . . . .                | 0.24       | 0.77                | 13.5    |
| Lysine base 4.31 . . . . .                   | 0.82       | —                   | —       |
| Tryptophane 7.00 . . . . .                   | 0.96       | —                   | —       |

N de NH<sub>3</sub> formé: 0.087 mg.

N du filtrat: 0.973 mg.

Bibliographie p. 90/91.

Il apparaît ainsi qu'une partie non négligeable de l'histidine est détruite au cours du traitement par l'acide chlorhydrique. Le chiffre de 0.95% obtenu pour la teneur du lysozyme en histidine doit donc être corrigé par addition de 0.13, ce qui donne, pour cette teneur, une valeur de 1.08. Il convient de remarquer que la correction en question ne peut être rigoureuse: l'histidine est en effet vraisemblablement plus labile quand elle est combinée dans la protéine que lorsqu'elle se trouve à l'état libre.

Valeur publiée précédemment: 2.6<sup>12</sup>.

Le dosage de l'*arginine* se fait par la méthode de SAKAGUCHI, selon la technique de McPHERSON<sup>25</sup>. Nous avons vérifié que ce dosage n'est pas gêné par la petite quantité d'histidine présente. Les valeurs trouvées pour l'arginine exprimées en base libre pour cent de lysozyme, sont les suivantes:

12.8; 13.5; 13.5; 13.6. Moyenne: 13.3.

Valeur trouvée antérieurement: 11.6%<sup>12</sup>.

L'estimation de la *lysine* résulte du calcul suivant: N Lysine = N bases totales (5.58) — N Arginine (4.22) — N Histidine (0.31) = 1.05 mg.

D'où, pour la lysine, exprimée en pour cent de lysozyme: 5.5.

Valeur trouvée antérieurement: 5.8%<sup>12</sup>.

#### ACIDES AMINÉS AROMATIQUES

La chromatographie de partage sur papier d'une gouttelette prélevée sur la fraction éluée du charbon, après concentration sous vide, montre que seules la tyrosine et la phénylalanine sont présentes, en tant qu'acides aminés, dans cette fraction. Il apparaît donc que la destruction du tryptophane est pratiquement totale dans les conditions d'hydrolyse réalisées ici, et que les substances qui en résultent ne réagissent pas à la ninhydrine.

L'azote total de la fraction éluée du charbon, correspondant à 100 mg de lysozyme sec et sans cendres, est, en mg:

0.89; 0.80; 0.86. Moyenne: 0.85.

C'est sur cette fraction éluée du charbon qu'est exécuté le dosage de la tyrosine, dont il a été question plus haut, et le dosage de la phénylalanine.

La faible intensité de la tache correspondant à la *phénylalanine* après chromatographie de partage sur le papier, indique que la proportion de cet acide aminé dans la fraction en question est inférieure ou au plus égale à celle de la tyrosine. Le dosage de la phénylalanine par colorimétrie selon la méthode de KAPELLER-ADLER<sup>26</sup> ne peut se faire en présence de tyrosine; la destruction préalable de cette dernière par le permanaganate de potassium, réalisable lorsque la quantité de tyrosine n'est pas trop importante par rapport à celle de la phénylalanine, n'aurait guère de sens ici, où la tyrosine est en excès par rapport à la phénylalanine. Nous avons donc déterminé la quantité de phénylalanine présente par un autre procédé: on verra plus loin que le nombre de résidus de tyrosine par molécule de lysozyme (poids moléculaire = 13900) est de 3. Le nombre de molécules de phénylalanine, d'après ce qui vient d'être dit, ne peut donc être égal qu'à un, deux ou au maximum trois. Nous avons donc fait des solutions de tyrosine et de phénylalanine correspondant, en ce qui concerne la tyrosine, à la concentration de la fraction éluée du charbon provenant de l'hydrolyse du lysozyme, et contenant une,

deux ou trois molécules de phénylalanine pour trois molécules de tyrosine. La comparaison de l'intensité des taches fournies par ces solutions avec celle des taches fournies par la solution éluee du charbon, après chromatographie sur papier (chromatographic unidimensionnelle avec du butanol comme solvant) et traitement à la ninhydrine, nous a permis de décider sans hésitation possible que le lysozyme renferme deux molécules de phénylalanine pour trois molécules de tyrosine.

En ce qui concerne l'azote total de la fraction éluee du charbon, il convient de faire la remarque suivante: L'azote de la tyrosine (0.26 mg) + l'azote de la phénylalanine (0.20 mg) retranchés de l'azote total (0.85) de la fraction, laissent 0.39 mg d'azote correspondant aux produits de décomposition du tryptophane. Ce n'est que 38% de l'azote du tryptophane (1.02 mg). Des expériences, dans le détail desquelles nous n'entrerons pas ici, faites sur le comportement du tryptophane et de ses produits de décomposition au cours des différentes opérations dont il s'agit ici, montrent que la perte en azote du tryptophane est due, pour la plus grande part, à la rétention d'une fraction importante des produits de décomposition du tryptophane par le charbon. Une telle rétention a d'ailleurs été observée déjà par G. SCHRAMM ET J. PRIMOSIGH<sup>27</sup>. C'est à quelques irrégularités dans cette rétention que l'on doit surtout attribuer les variations observées dans l'azote total contenu dans les fractions éluees du charbon, fractions provenant de différentes opérations concernant cependant une même quantité initiale de lysozyme.

#### ACIDES DICARBOXYLIQUES

La chromatographie de partage sur papier d'une gouttelette prélevée sur la fraction éluee de l'alumine après concentration sous vide, montre que seuls en tant que substances réagissant à la ninhydrine l'acide aspartique et l'acide glutamique sont présents dans cette fraction. La séparation des acides dicarboxyliques est donc bien spécifique.

L'azote total de l'ensemble des acides dicarboxyliques correspondant à 100 mg de lysozyme est, en mg:

2.55; 2.67. Moyenne: 2.61.

Le dosage de l'*acide aspartique* est fait tout d'abord par la méthode de FROMAGEOT ET COLAS<sup>28</sup>, dérivant de celle indiquée autrefois par FROMAGEOT ET HEITZ<sup>29</sup>, rendue spécifique pour l'acide aspartique par la séparation préalable de cet acide des autres acides aminés générateurs d'acétaldéhyde. Les valeurs trouvées, pour cent de lysozyme, sont les suivantes:

10.2; 10.1. Moyenne: 10.2.

Une deuxième série de dosages a été exécutée par la méthode de FISHER, PARSONS ET MORRISON<sup>30</sup>, dans des conditions qui seront exposées en détail dans le travail suivant. La moyenne des résultats obtenus dans la mesure des surfaces de 19 taches correspond à une teneur en acide aspartique de 10.9% de lysozyme. Cette valeur est en excellent accord avec la précédente, obtenue par une voie tout à fait différente; la moyenne générale est ainsi de 10.6%. Aucune autre valeur concernant la teneur du lysozyme en acide aspartique ne semble avoir été publiée jusqu'ici.

Le dosage de l'*acide glutamique* est fait par la méthode de FISHER, PARSONS ET MORRISON<sup>30</sup>; les déterminations ont porté sur 9 taches. La moyenne des résultats obtenus correspond à une teneur en acide glutamique de 3.0% de lysozyme.

Valeur trouvée antérieurement: 3.5%<sup>31</sup>.

En ce qui concerne l'azote total de la fraction éluee de l'alumine, il convient de faire la remarque suivante: l'azote de l'acide aspartique (1.10 mg) + l'azote de l'acide glutamique (0.30 mg) retranché de l'azote total (2.61 mg) de la fraction, laisse 1.21 mg d'azote de nature non définie. Plusieurs observations nous ont montré que c'est seulement dans le cas du lysozyme, particulièrement riche en tryptophane, que l'on observe ainsi un excès de l'azote total de la fraction éluee de l'alumine, sur l'azote correspondant à la somme des deux acides dicarboxyliques. Nous en concluons que cet azote en excès correspond à des produits de décomposition du tryptophane.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'ensemble des résultats précédents est groupé dans le Tableau III.

TABLEAU III

#### TENEUR DU LYSOZYME EN DIVERS ACIDES AMINÉS

Le teneur du lysozyme en azote total est considérée comme égale à 16.7%.

| Acide aminé         | Acide aminé pour 100 de lysozyme |        | Poids moléculaire minimum du lysozyme | Nombre de Résidus | Poids moléculaire du lysozyme |
|---------------------|----------------------------------|--------|---------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
|                     | Calculé                          | Trouvé |                                       |                   |                               |
| Tryptophane . . .   | 7.33                             | 7.47   | 2730                                  | 5                 | 13650                         |
| Tyrosine . . . . .  | 3.91                             | 3.83   | 4720                                  | 3                 | 14150                         |
| Phénylalanine . . . | 2.37                             | —      | —                                     | 2                 | —                             |
| Ac. aspartique . .  | 10.5                             | 10.6   | 1380                                  | 11                | 13800                         |
| Ac. glutamique . .  | 3.17                             | 3.0    | —                                     | 3                 | —                             |
| Arginine . . . . .  | 13.7                             | 13.4   | 1300                                  | 11                | 14300                         |
| Histidine . . . . . | 1.11                             | 1.08   | 14350                                 | 1                 | 14350                         |
| Lysine . . . . .    | 5.25                             | 5.5    | 2650                                  | 5                 | 13250                         |
| Moyenne:            |                                  |        |                                       |                   | 13900                         |

Ces premiers résultats permettent en premier lieu de préciser le poids moléculaire du lysozyme. Ce poids moléculaire a été donné comme étant successivement de 25000<sup>10</sup>, 18000<sup>12</sup>, 17500<sup>1</sup>, 14000 à 17000<sup>1</sup>, 13000<sup>32</sup> et 13900 ± 600<sup>33</sup>.

A priori, la valeur la plus sûre doit être 13900 ± 600 qui est fournie par une étude de la diffraction des rayons X. Les résultats analytiques obtenus ici sont en excellent accord avec cette dernière valeur. Le dosage de l'histidine et celui de la tyrosine, dont il existe respectivement un et trois résidus par molécule de lysozyme, sont particulièrement intéressants à ce point de vue.

En ce qui concerne la valeur trouvée pour l'acide glutamique, celle-ci est sensiblement inférieure à 3.17%, valeur qui correspondrait à la présence de trois résidus d'acide glutamique dans une molécule de lysozyme de poids moléculaire de 13900. Il semble néanmoins que le nombre de résidus d'acide glutamique soit bien ici de trois; le fait de trouver après hydrolyse acide une valeur inférieure, peut s'expliquer en effet par la destruction de l'acide glutamique au cours de cette hydrolyse, notamment par sa cyclisation bien connue en acide pyrolidone-carbonique. Le dosage de l'acide glutamique a été effectué ici par comparaison avec les données fournies par un mélange d'acide glutamique et de tryptophane, en proportion convenable, traité par l'acide chlor-

Bibliographie p. 90/91.

hydrique dans les conditions de l'hydrolyse; mais il est vraisemblable que la labilité de l'acide glutamique combiné dans le lysozyme est supérieure à celle du même acide à l'état libre.

D'autre part, en ce qui concerne la teneur en acides dicarboxyliques totaux, celle-ci correspond à la présence de 14 groupements carboxyliques en  $\omega$ . Or, d'après les données de FRAENKEL-CONRAT<sup>34</sup>, on peut calculer que le lysozyme contient 14 groupements amides pour un poids moléculaire de 13900. La molécule de lysozyme ne renfermerait ainsi aucun groupement carboxylique libre, les acides aspartique et glutamique s'y trouvant entièrement sous forme de leurs amides respectifs.

D'autre part enfin, le lysozyme apparaît comme une protéine particulièrement riche en tryptophane. Si l'on ne tient pas compte de la gramicidine, qui est un polypeptide et non une protéine, on ne connaît guère, jusqu'ici, que le venin d'abeille qui présente une teneur comparable en tryptophane<sup>35</sup>.

### RÉSUMÉ

L'analyse du lysozyme pur, cristallisé, préparé à partir du blanc d'œuf selon la méthode de ALDERTON ET FEVOLD, a été faite en utilisant la technique de séparation des acides aminés en groupe, qui a été décrite précédemment par FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER. Cette analyse porte ici sur les acides aminés aromatiques, les bases hexoniques et les acides dicarboxyliques. Les résultats obtenus, exprimés en résidus par molécule de lysozyme de poids moléculaire égal à 13900, sont les suivants: tryptophane 5, tyrosine 3, phénylalanine 2, acide aspartique 11, acide glutamique 3, arginine 11, histidine 1, lysine 5. Les valeurs trouvées, en particulier pour l'histidine et la tyrosine, permettent de déterminer un poids moléculaire (13900) en excellent accord avec celui que PALMER, BALLANTYNE ET GALVIN ont calculé à partir des données fournies par la diffraction des rayons X.

### SUMMARY

Pure crystallized lysozyme, prepared from egg white using the method of ALDERTON AND FEVOLD, has been analysed by separation of the amino-acids into groups, as described by FROMAGEOT, JUTISZ, AND LEDERER. The analysis concerned aromatic amino-acids, hexonic bases and dicarboxylic acids. The results expressed in radicals per molecule of lysozyme are as follows: tryptophan 5, tyrosine 3, phenylalanine 2, aspartic acid 11, glutamic acid 3, arginine 11, histidine 1, lysine 5. These figures, especially the ones for histidine and tyrosine, allow the determination of a molecular weight (13900) in excellent agreement with that calculated by PALMER, BALLANTYNE, AND GALVIN from the results of X-ray diffraction spectra.

### ZUSAMMENFASSUNG

Reines, kristallisiertes Lysozym, welches aus Eiweiss nach der Methode von ALDERTON UND FEVOLD hergestellt worden war, wurde nach der von FROMAGEOT, JUTISZ UND LEDERER früher beschriebenen Trennungsmethode der Aminosäuren in Gruppen analysiert. Diese Analyse erfasst hier die aromatischen Aminosäuren, die Hexonbasen und die zweibasischen Säuren.

Die erhaltenen Resultate sind in Resten pro Lysozymmolekül vom Molekulargewicht 13900 wie folgt ausgedrückt: Tryptophan 5, Thyrosin 3, Phenylalanin 2, Asparaginsäure 14, Glutaminsäure 3, Arginin 11, Histidin 1, Lysin 5.

Aus diesen Werten, insbesondere aus denjenigen für Histidin und Thyrosin, kann für das Molekulargewicht ein Wert (13900) bestimmt werden, der mit dem von PALMER, BALLANTYNE UND GALVIN aus Röntgenstrahlendiffraktionen errechneten ausgezeichnet übereinstimmt.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. ALDERTON, W. H. WARD ET H. L. FEVOLD, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 43.
- <sup>2</sup> G. ALDERTON ET H. L. FEVOLD, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 1.
- <sup>3</sup> E. H. BOASSON, *Thèse*, Amsterdam 1937.
- <sup>4</sup> K. MEYER ET E. HAHNEL, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 723.

- <sup>5</sup> N. E. GOLDWORTHY ET H. W. FLOREY, *Brit. J. Exptl Path.*, 11 (1930) 192.
- <sup>6</sup> E. BRAND ET B. KASSELL, *J. Biol. Chem.*, 131 (1939) 489.
- <sup>7</sup> R. KUHN, L. BIRKOFER ET F. W. QUACKENBUSH, *Ber.*, 72 (1939) 407.
- <sup>8</sup> A. C. CHIBNALL, M. W. REES ET E. F. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 37 (1943) 354.
- <sup>9</sup> D. D. VAN SLYKE, A. HILLER ET R. T. DILLON, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 137.
- <sup>10</sup> K. MEYER, R. THOMPSON, J. W. PALMER ET D. KHORAZO, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 303.
- <sup>11</sup> E. A. H. ROBERTS ET A. Q. WELLS, *Quart. J. Exptl Physiol.*, 27 (1937) 89.
- <sup>12</sup> E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 33 (1939) 622.
- <sup>13</sup> R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- <sup>14</sup> C. E. GRAHAM, E. P. SMITH, S. W. HIER ET D. KLEIN, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 711.
- <sup>15</sup> M. X. SULLIVAN ET W. C. HESS, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 441.
- <sup>16</sup> W. C. HESS ET M. X. SULLIVAN, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 17 (1945) 717.
- <sup>17</sup> R. W. BATES, *Proc. Am. Soc. Biol. Chem., J. Biol. Chem.*, 119 (1939) VII.
- <sup>18</sup> E. P. ABRAHAM ET R. ROBINSON, *Nature*, 140 (1937) 24.
- <sup>19</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, B. A. BRANDON ET H. S. OLcott, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 99.
- <sup>20</sup> O. FÜRTH ET Z. DISCHE, *Biochem. Z.*, 146 (1924) 275.
- <sup>21</sup> O. FOLIN ET A. D. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 89.
- <sup>22</sup> R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1935) 283.
- <sup>23</sup> J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 32 (1938) 775.
- <sup>24</sup> C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- <sup>25</sup> H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 470.
- <sup>26</sup> R. KAPPELER-ADLER, *Biochem. Z.*, 252 (1932) 185.
- <sup>27</sup> G. SCHRAMM ET J. PRIMOSIGH, *Ber.*, 77 (1944) 417.
- <sup>28</sup> C. FROMAGEOT ET R. COLAS, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- <sup>29</sup> C. FROMAGEOT ET P. HEITZ, *Mikrochim. Acta*, 3 (1938) 52.
- <sup>30</sup> R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- <sup>31</sup> J. C. LEWIS ET H. S. OLcott, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 265.
- <sup>32</sup> A. G. PASYNSKII ET V. PLASKEEV, *Compt. rend. acad. sci. U.R.S.S.*, 48 (1945) 579.
- <sup>33</sup> K. J. PALMER, M. BALLANTyne ET J. A. GALVIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 906.
- <sup>34</sup> H. L. FRAENKEL-CONRAT, M. COOPER ET H. S. OLcott, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 950.
- <sup>35</sup> M. REINERT, *Festschrift für EMIL CHRISTOPH BARELL*, Basel (1938) 407.