

Short Communications and Preliminary Notes

SUR LES AMINOACIDES LIBÉRÉS PENDANT L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE DE CHEVAL PAR LA PEPSINE, LA TRYPSINE ET LA CHYMOTRYPSINE CRISTALLISÉES

par

M. ROVERY ET P. DESNUELLE

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,
Marseille (France)*

Nous nous sommes proposés d'étudier par les techniques chromatographiques classiques les aminoacides éventuellement *libérés* par les trois endopeptidases digestives*. Dans le présent travail, le substrat choisi est la globine de cheval (560 restes d'acides aminés par mol) que nous avons déjà utilisée^{1,2}. L'action enzymatique est arrêtée au moment où l'hydrolyse, sortie de sa phase initiale rapide, atteint un stade à peu près stationnaire caractérisé par les chiffres suivants:

TABLEAU I

Enzymes		Hydrolyse				
Nature	Proportions (%)	Durée (h)	pH	Nombre de liaisons rompues par mol (VAN SLYKE)	Aminoacides libérés par mol (ninhydrine)	NPN (en % du N total)
Pepsine	3.0	3	1.8	99	8.7	100
Trypsine	0.66	5	9.7	63	5.2	60
Chymotrypsine	0.20	5	9.7	74	5.3	75

Les hydrolysats ($pH = 7.8$), précipités par 10 fois leur volume d'alcool, sont dessalés par ionophorèse** (pepsine) ou par extraction acétonique³ de leur résidu sec (trypsine ou chymotrypsine). Ayant constaté d'autre part, que la pepsine libérait des quantités notables d'un aminoacide aromatique, celui-ci est concentré par chromatographie sur charbon⁵. Les divers liquides sont ensuite chromatographiés sur papier (phénol et mélange butanol-acide formique). Tous les essais-témoins possibles ont été faits sur des quantités d'acides aminés ne dépassant pas 0.25 mol par mol de protéine en jeu. Aucune perte sensible n'a été constatée.

L'hydrolysat pepsique renferme environ 1 mol de phénylalanine, l'hydrolysat tryptique 0.26 mol de lysine et l'hydrolysat chymotryptique une quantité très faible d'un aminoacide libre (probablement l'arginine). Aucun autre aminoacide n'a été caractérisé en quantités vraiment significatives.

Ces observations montrent que, dans l'exemple étudié:

1. Les quantités réelles d'acides aminés libres sont bien inférieures à celles que le dosage à la ninhydrine laisse prévoir (Tableau I). On considérera donc avec réserve les résultats de ce dosage,

* Manuscrit reçu le 5 juin 1951 (Réd.).

** La dégradation importante que subissent la lysine et surtout l'arginine pendant l'ionophorèse, signalée tout récemment⁵ et constatée indépendamment au cours du présent travail, nous a empêché de dessaler ainsi les hydrolysats tryptiques et chymotryptiques.

quand le N-COOH ne dépasse pas 1-2% du N-total tout au moins. Il est tout à fait possible que, dans de nombreux cas, les endopeptidases engendrent encore beaucoup moins d'acides aminés libres qu'on le croit communément.

2. Chaque enzyme libère un *seul* acide aminé en manifestant une spécificité analogue à celle établie par BERGMANN *et al.* sur des peptides synthétiques (sauf dans le cas, d'ailleurs assez douteux, de la chymotrypsine). Toutefois, c'est la phénylalanine qui est libérée par la pepsine et non la tyrosine, comme on aurait pu le penser^{6,7}.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. DESNUELLE, M. ROVERY ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 116.
- ² M. ROVERY, P. DESNUELLE ET G. BONJOUR, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 166.
- ³ P. BOULANGER ET G. BIZERTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 696.
- ⁴ W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 103.
- ⁵ C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ⁶ H. O. CALVERY ET E. D. SCHOCK, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 15.
- ⁷ V. M. INGRAM, *Nature*, 167 (1951) 83.

Reçu le 15 septembre 1951

MACROMOLECULAR PROPERTIES OF CARRAGEENIN

by

W. H. COOK, R. C. ROSE, AND J. R. COLVIN

*Division of Applied Biology, National Research Laboratories,
Ottawa (Canada)*

Carrageenin, a polysaccharide obtained from the marine algae *Chondrus crispus* is predominantly composed of D-galactose residues linked 1:3 with an ethereal sulphate on C₄¹. Such a structure does not account for the entire molecule and recently JOHNSTON AND PERCIVAL² isolated L-galactose from a resistant fragment poor in sulphate groups and showing evidence of a branched structure. Their interpretation is that the molecule is complex but they admit the possibility that carrageenin is a mixture as suggested by earlier workers³.

An electrophoretic analysis was undertaken on four samples, within the intrinsic viscosity range from 3.4 to 11.2, since separation should have been possible if the components differed in their content of ionizing sulphate groups. This analysis revealed considerable spreading but no evidence of separable components and all samples had similar mean mobilities.

The same samples were then used to estimate the molecular parameters of carrageenin by sedimentation and diffusion studies. Over the three-fold range in intrinsic viscosity the molecular weight increased from 110,000 to 530,000, the axial ratio from 160 to 340 and the diameter of the ellipsoid of rotation from 9.9 to 13.5 Å assuming no solvation. These are mean values since all samples were polydisperse and two components were revealed during sedimentation. The more rapidly sedimenting component, absent in the sample of lowest viscosity, increased to about 12% of the most viscous sample. Since the mean values are comparable with those reported for cellulose⁴, it appears that the major component of carrageenin has a linear structure. The more rapidly sedimenting minor component must differ in size or shape and it may be branched but this cannot be established from these measurements.

Full details of this investigation will be published later in this journal*. Work is continuing on the characterization of the two components found during sedimentation.

REFERENCES

- ¹ J. BUCHANAN, E. E. PERCIVAL, AND E. G. V. PERCIVAL, *J. Chem. Soc.*, (1943) 51.
- ² R. JOHNSTON AND E. G. V. PERCIVAL, *J. Chem. Soc.*, (1950) 1994.
- ³ P. HAAS AND B. RUSSELL-WELLS, *Biochem. J.*, 23 (1929) 425.
- ⁴ N. GRALÉN, *Sedimentation and Diffusion Measurements on Cellulose and Cellulose Derivatives*, Inaugural Dissertation, Upsala, 1944.

Received October 1st, 1951

* Manuscript received August 13th, 1951 (Ed.).