

Short Communications and Preliminary Notes

NOUVELLE DÉTERMINATION DES ACIDES AMINÉS BASIQUES DU LYSOZYME

par

ROGER MONIER, YVES GENDRON,
MARIAN JUTISZ ET CLAUDE FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

La constitution globale en acides aminés du lysozyme est actuellement à peu près complètement élucidée¹. Quelques incertitudes subsistent toutefois, notamment en ce qui concerne la teneur en lysine¹. Il était donc utile de reprendre le dosage des trois acides aminés basiques du lysozyme, histidine, lysine et arginine, par un procédé fondamentalement différent de ceux utilisés jusqu'ici. Dans ce but, nous avons utilisé la méthode de MOORE ET STEIN², en mettant en oeuvre une colonne de Dowex 50 et les tampons préconisés par ces auteurs, et en employant un appareil collecteur de fractions* analogue à celui décrit par JAMES, MARTIN ET RANDALL³.

Une première série d'expériences, faites en utilisant des mélanges connus des trois bases, soigneusement purifiées, et dans des proportions voisines de celles où elles existent dans le lysozyme, nous a montré que leur séparation et leur récupération étaient quantitatives (à 2 % près) pour la lysine et l'arginine, et moins régulières pour l'histidine; cette irrégularité, que l'on retrouve dans les chiffres du Tableau I, est due à la quantité de cette dernière base, faible ici par rapport à celle des deux autres.

Le lysozyme cristallisé, homogène, est hydrolysé par HCl 6 N à 110°, pendant 24 heures, en tube scellé, sous vide. L'hydrolysât, traité de la manière habituelle, est repris par le tampon (citrate 0.1 M) à pH 5.0, de façon qu'une prise de 1 ml corresponde à environ 6 mg de lysozyme isoélectrique. Cette prise, placée sur la colonne, est suivie de la série de tampons décrits par MOORE ET STEIN². Le premier tampon à pH 5 permet d'éliminer les acides aminés autres que le tryptophane et les trois acides aminés basiques; ceux-ci, de même que l'ammoniac, sortent entre les tubes 30 et 250 (Fig. 1).

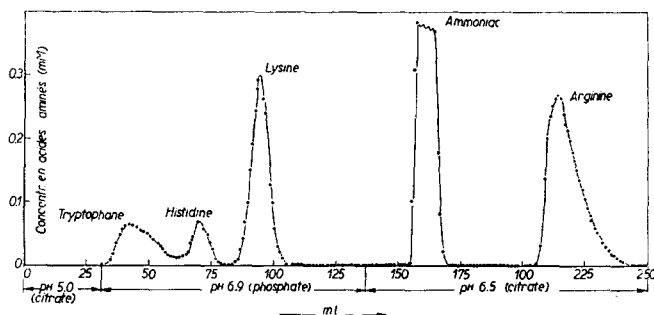


Fig. 1. Courbe correspondant à l'expérience 4; lysozyme isoélectrique 5.68 mg

Les résultats obtenus sont donnés par les courbes de la Fig. 1 et les chiffres du tableau ci-dessous. Exprimés en résidus par molécule de lysozyme ($N = 18.6\%$; P.M. = 14,700), les chiffres du Tableau I correspondent à: Histidine 1, Lysine 6, Arginine 11. Ces valeurs confirment d'une façon parfaite celles que LEWIS *et al.*⁴ avaient obtenues par voie microbiologique. En ce qui concerne le trypto-

* Cet appareil a pu être construit grâce à l'aide de la Fondation Rockefeller, que nous sommes heureux de remercier ici.

phane, on retrouve de 50 à 60 % de la quantité initialement contenue dans la protéine. Quant à l'ammoniac, sa récupération est irrégulière; on trouve des valeurs oscillant entre 1.7 et 2.0, avec une moyenne de 1.8 % de lysozyme.

TABLEAU I
RÉCUPÉRATION DES ACIDES AMINÉS BASIQUES, EN % DU LYSOZYME

Expérience	Histidine	Lysine	Arginine
1	—	—	13.4
2	0.83	5.94	12.8
3	1.54	6.00	13.1
4	1.12	6.16	12.9
Moyenne:	1.16	6.03	13.1
Résidus:	1.1	6.1	11.0

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ H. L. FEVOLD, *Adv. in Protein Chemistry*, 6 (1951) 188.
² S. MOORE ET W. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
³ A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN ET S. S. RANDALL, *Biochem. J.*, 49 (1951) 293.
⁴ J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSCHMANN ET H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 23.

Reçu le 6 mars 1952

CO₂-FIXATION IN PIGEON BREAST MUSCLE

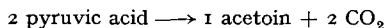
by

C. H. MONFOORT

Laboratory for Physiological Chemistry, The University, Utrecht (Netherlands)

GRUBER AND MEIJER¹ found indications of a CO₂-fixation reaction, influenced by the addition of thiamine pyrophosphate (TPP) *in vitro*, occurring under anaerobic conditions in Latapie mince of the muscle of the left ventricle of the pig heart. I succeeded in finding more distinct clues for the occurrence of such a reaction in homogenates of pigeon breast muscle (m. pectoralis major) in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.2. Working with pigeons offers the great advantage as compared with pig heart that the activity of certain enzymes, capable of metabolizing pyruvic acid under anaerobic conditions, can be studied in several stages of vitamin-B₁ deficiency, so that the role of thiamine pyrophosphate in connection with these reactions can be established more conclusively.

The amounts of acetoin formed from Na pyruvate were compared with the amounts of CO₂ produced simultaneously. In Mn⁺⁺ supplemented homogenates of breast muscle of normally fed pigeons, the amount of CO₂ produced always showed a deficit as compared with the amount calculated according to the reaction:



The deficit is increased by adding TPP *in vitro*. This effect is probably due to damage of the tissue by homogenizing. Breast muscle homogenates from pigeons, which had consumed a carbohydrate-rich, thiamine-free diet² administered by forced feeding for twelve days, showed no or only a very slight CO₂ deficit, under the same conditions, which was again increased to the values found for homogenates from normal pigeons by addition of TPP *in vitro* (Table I). This CO₂ deficit can in my opinion only be interpreted by assuming a reaction consuming CO₂, viz. CO₂-fixation. The presence of Mn⁺⁺ has been shown to be essential in all cases of CO₂-fixation studied by other authors (see OCHOA³). Hence my observation, that the described CO₂ deficit is absent when Mn⁺⁺ is omitted or replaced by Mg⁺⁺, provides further evidence for the presumed TPP-catalyzed CO₂-fixation in pigeon breast muscle homogenate.

In homogenates of the muscle of the left ventricle of the pigeon heart the CO₂ production