

INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA STABILITÉ DU COMPLEXE TRYPSINE-OVOMUCOÏDE

par

LUIGI GORINI ET LUCIENNE AUDRAIN

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

On sait que l'ovomucoïde inhibe la trypsine en se combinant avec elle molécule à molécule¹, cette combinaison faisant intervenir des groupes de la trypsine autres que ceux auxquels est due l'activité protéolytique de cette dernière². Nous avons constaté tout d'abord que: (a) une telle inhibition n'est pas influencée par les ions Ca^{++} ; (b) les ions Ca^{++} n'ont pas non plus d'action sur la stabilité, à 37°, de l'ovomucoïde* seul: en effet, ce dernier, maintenu à cette température en solution $7 \cdot 10^{-6} M$ dans du tampon borate⁴ ($5 \cdot 10^{-2} M$) à pH 7.9, conserve, même après 72 heures, la totalité de son pouvoir inhibiteur vis à vis de la trypsine**, en présence ou non d'ions Ca^{++} ($10^{-2} M$); (c) le complexe trypsine-ovomucoïde possède une activité protéolytique propre: en effet, l'inhibition par l'ovomucoïde de l'activité protéolytique d'une solution de trypsine, inhibition qui croît proportionnellement à la quantité d'ovomucoïde ajoutée, atteint son maximum lorsque une molécule d'ovomucoïde se trouve en présence d'une molécule de trypsine; mais ce maximum ne correspond pas à une inhibition totale: à partir de ce moment, le milieu conserve une activité protéolytique pratiquement constante, quel que soit l'excès d'ovomucoïde que l'on ajoute. Cette activité protéolytique, que l'on doit ainsi attribuer au complexe trypsine-ovomucoïde, est, dans nos expériences, les 7 % de celle que présenterait la trypsine présente dans le milieu si elle était libre.

Diverses observations que nous résumons ici montrent que, à l'inverse de ce qui se passe lorsque l'ovomucoïde est seul en solution, les ions Ca^{++} exercent une action très nette sur l'ovomucoïde combiné à la trypsine, en en altérant la stabilité à 37°: si on maintient à cette température une solution à pH 7.9 (tampon borate), contenant à la fois de l'ovomucoïde $7 \cdot 10^{-6} M$ (200 $\mu\text{g/ml}$) et de la trypsine $6 \cdot 10^{-6} M$ (200 $\mu\text{g/ml}$), cette dernière étant ainsi en léger défaut, on constate que la présence de calcium dans cette solution provoque la disparition de l'ovomucoïde (Tableau I, colonne 4). La présence du métal protège de l'inactivation qu'elle subirait en son absence, aussi bien la trypsine libérée de l'ovomucoïde par suite de la disparition de ce dernier, que la trypsine libre en l'absence d'ovomucoïde^{5,6}. Une telle disparition de l'ovomucoïde est accompagnée de son hydrolyse, comme le montre l'apparition de peptides dialysables. Or, l'ovomucoïde ne peut devenir un substrat de la trypsine qu'après avoir perdu son activité antitrypsique; on doit donc conclure que la présence simultanée des ions Ca^{++} et de la trypsine provoque une inactivation rapide de l'ovomucoïde, laquelle ne se produit absolument pas en l'absence de trypsine et ne se produit que très lentement (Tableau I,

TABLEAU I

L'activité protéolytique est donnée par l'accroissement $\times 10^3$ du coefficient d'extinction à 280 $m\mu$ de la partie rendue soluble dans l'acide trichloracétique à 5 %, d'une solution à 2 % de sérumalbumine dénaturée, après protéolyse de 10 minutes à 25°. Cinétique d'une réaction d'ordre zéro.

Trypsine $6 \cdot 10^{-6} M$ (tampon borate pH 7.9) avec ou sans ovomucoïde $7 \cdot 10^{-6} M$, conservée à 37° ou à 0°.

Conditions de conservation	Activité protéolytique			
	Sans autre traitement		Après addition de $\text{Ca } 10^{-2} M$ et après 24 heures supplémentaires à 37°	
	Trypsine seule (1)	Trypsine ovomucoïde (2)	Trypsine seule (3)	Trypsine ovomucoïde (4)
zéro heures à 37°	270	20	150	154
15 — — —	0	36	0	123
24 — — —	0	30	0	113
48 — — —	0	33	0	70
48 — — 0°	250	32	132	140

* L'ovomucoïde utilisé ici a été préparé selon FREDERIQ ET DEUTSCH³.

** Trypsine cristallisée Worthington.

colonne 2) en sa présence. Le rôle du calcium sur le complexe trypsine-ovomucoïde est ainsi double: d'une part il accélère considérablement l'inactivation de l'ovomucoïde, d'autre part il agit en protecteur de la trypsine libérée par cette inactivation.

Remarquons enfin que la trypsine, lorsqu'elle se trouve sous forme de complexe trypsine-ovomucoïde, est protégée contre l'action inactivante de la température de façon encore plus efficace que par le calcium lorsqu'elle est libre.

L'ensemble de ces résultats conduit à penser que l'ovomucoïde existe en solution sous une forme active et une forme inactive en équilibre; le calcium et la trypsine agissent tous deux sur cet équilibre, le premier en le déplaçant en faveur de la forme inactive, la deuxième en le détruisant parce qu'elle hydrolyse cette forme inactive. Une étude plus détaillée de cet équilibre sera publiée dans ce même journal.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ H. LINEWEAVER ET C. W. MURRAY, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 565.
- ² H. FRAENKEL-CONRAT, R. S. BEAN ET H. LINEWEAVER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 385.
- ³ E. FREDERIQ ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499.
- ⁴ W. M. CLARK, *The Determination of Hydrogen Ions*, Baltimore, 1928.
- ⁵ L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 318.
- ⁶ M. BIER ET F. F. NORD, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33 (1951) 320.

Reçu le 26 avril 1952

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LINSEED MUCILAGE

by

L. MASSART AND E. VAN DER AUWERMEULEN

Biochemical Laboratory, The University, Ghent (Belgium)

As far as we know an enzymatic hydrolysis of linseed mucilage has never been reported. After reading PIGMAN's review in SUMNER AND MYRBÄCK¹ it even looks as if an attempt was never made to prove the existence of enzymes attacking linseed mucilage.

We have now found that a commercial preparation of hemicellulase of fungal origin, brought on the market by the Paul Lewis Laboratories and by General Biochemicals, Inc., contains an enzyme which reduces the viscosity of solutions of linseed mucilage, accompanied by a production of reducing sugars.

The mucilage was obtained by the extraction of linseed with water and precipitation and reprecipitation with alcohol. 0.4 % solutions were made in appropriate buffer solutions and the declining viscosity was measured in a Höppler or an Ostwald viscometer. Controls were run with boiled solutions of the enzyme.

Reducing sugars were determined according to SUMNER AND SOMERS², pentoses according to MASSART AND HOSTE³. Paper chromatography was carried out with butanol as the solvent and aniline-oxalate as the detector.

Our main results can be summarized as follows:

1. the viscosity declines very rapidly during the first minutes, later more slowly but steadily without reaching the viscosity of water even after hours;
2. the amount of reducing groups set free grows rapidly at first, later more steadily;
3. paper chromatography reveals the existence of galactose and xylose after enzymatic hydrolysis;
4. the optimum pH of the enzymatic hydrolysis is 6; exposure to pH 2.1 for 30 min inactivates the enzyme;
5. above 40° C the rate of hydrolysis diminishes; exposure to 85° C for 30 min inactivates the enzyme;
6. the enzyme is precipitated by treating with ammonium sulphate 66.6 % sat.

These and other results together with a discussion will be submitted for publication in this journal.

REFERENCES

- ¹ W. PIGMAN in J. B. SUMNER AND K. MYRBÄCK, *The enzymes*, Vol. 1, Part 2, New York, 1950, p. 725.
- ² J. B. SUMNER AND G. F. SOMERS, *Laboratory Experiments*, New York, 1949, p. 38.
- ³ L. MASSART AND J. HOSTE, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 83.

Received April 2nd, 1952