

LA DÉTERMINATION DES
GROUPES CARBOXYLIQUES DES PROTÉINES

II. LE GROUPE CARBOXYLIQUE TERMINAL DE L'OVOMUCOÏDE*

par

LUCIEN PÉNASSE, MARIAN JUTISZ,

CLAUDE FROMAGEOT ET HEINZ FRAENKEL-CONRAT

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

On sait que l'ovomucoïde (N total = 13.1%)¹ est une glucoprotéine de poids moléculaire voisin de 28,000². Sa teneur en les divers acides aminés a été établie par LEWIS *et coll.*¹ et sa teneur en sucres par STACEY ET WOOLLEY³ et FREDERICQ ET DEUTSCH⁴. D'après ces derniers, la glucosamine constitue environ 17% de la protéine. Récemment, FRAENKEL-CONRAT ET PORTER⁵ ont montré que l'ovomucoïde ne renferme qu'un seul groupe aminé libre terminal, lequel appartient à lalanine. Il nous a paru intéressant d'appliquer à l'ovomucoïde la méthode de détermination des groupes carboxyliques terminaux libres que nous avons utilisée précédemment⁶ pour l'insuline. Cette application a été ici l'occasion d'améliorer la forme initiale de cette méthode. Nous montrons ainsi qu'il existe dans la molécule d'ovomucoïde un seul groupe carboxylique libre terminal, et que ce groupe appartient à la phénylalanine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'ovomucoïde utilisé a été préparé à partir du blanc d'oeuf de poule, selon la technique de LINEWEAVER ET MURRAY⁷. Après diverses expériences préliminaires, nous nous sommes arrêtés au mode opératoire suivant que nous décrivons tel que nous l'avons appliqué dans un cas précis:

I. *Réduction de la protéine.* L'ovomucoïde est séché sous vide à 60° et finement broyé; 360 mg sont mis en suspension dans 30 ml de N-éthylmorpholine préalablement séchée et fraîchement redistillée; le tout est additionné de 25 ml de N-éthylmorpholine renfermant 250 mg d'hydrure double de lithium et d'aluminium. L'ensemble est agité pendant 8 heures à 60° sous atmosphère d'azote sec. Au bout de ce temps, on décompose l'excès d'hydrure métallique par introduction de quelques gouttes de morpholine aqueuse, on filtre et on lave soigneusement à l'éther le précipité pour éliminer la morpholine. Le résidu solide est alors repris par une quantité (environ 10 ml) d'acide chlorhydrique 6 N, suffisante pour neutraliser les hydroxydes métalliques; après agitation dans un tube de centrifugeuse, puis centrifugation, le résidu non encore dissous est

* Nous sommes heureux de remercier la Fondation Rockefeller de l'aide matérielle qu'elle a apportée à l'exécution de ce travail.

Bibliographie p. 556.

repris cinq à six fois par $HCl 0.1 N$ jusqu'à dissolution totale. Les solutions sont réunies (90 à 100 ml) et soumises à une dialyse, d'abord contre eau ordinaire courante pendant 20 heures à 15°, puis contre eau distillée pendant 6 heures à 15°. On concentre la solution par évaporation à travers le tube dialyseur au moyen d'un courant d'air chaud, puis on lyophilise. La protéine réduite ainsi obtenue se présente sous l'aspect d'une poudre légère, parfaitement blanche, très hygroscopique, et qu'il convient de garder en tube scellé sous vide.

L'identité des rapports N total/(histidine + tyrosine) et N amidé/ N total (Tableau I), respectivement dans l'ovomucoïde initial et dans l'ovomucoïde réduit, montre que le traitement par l'hydrure métallique ne provoque aucune perte sensible d'azote; en particulier les groupes amidés sont respectés, de même que la partie de la molécule contenant la glucosamine. La faiblesse relative de la teneur en azote total du produit résultant de la réduction est due uniquement à la présence d'une petite quantité d'alumine non éliminée par la dialyse.

TABLEAU I
ANALYSE COMPARÉE DE L'OVOMUCOÏDE INITIAL ET DE L'OVOMUCOÏDE RÉDUIT

| | Ovomucoïde initial | Ovomucoïde réduit |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|
| N total | 12.8 % | 9.7 % |
| N total/(histidine + tyrosine) | 2.37 | 2.38 |
| N amidé/ N total | 0.0753 | 0.0744 |

II. *Isollement et caractérisation du ou des aminoalcools.* 154 mg du produit lyophilisé comme il vient d'être dit sont hydrolysés en tubes scellés sous vide par $HCl 6 N$ à 105° pendant 18 heures. On élimine la majeure partie de l'acide chlorhydrique de l'hydrolysat par évaporations successives sous vide. Le résidu est finalement repris par l'eau; sa teneur en azote total (micro-kjeldahl) est de 14.85 mg. La solution est amenée à pH 8.5 par $LiOH N$; à ce pH, sous vide et à 35°, l'ammoniac est complètement entraîné par un courant de vapeur d'eau en 15 minutes environ, alors que tous les aminoalcools restent intégralement dans la solution. Cette dernière, débarrassée de l'ammoniac, est neutralisée par HCl puis déminéralisée dans l'appareil précédemment décrit⁸ (20 minutes sous une tension croissant de 20 à 130 volts et avec une intensité décroissant de 1 à 0.3 ampère).

Des expériences témoins, faites sur quelques aminoalcools (colamine, alaninol, phénylalaninol, aspartidol, glutamidiol) nous ont montré que ceux-ci ne sont pas détruits au cours d'une telle opération: 10 ml d'une solution de l'aminoalcool, contenant environ 1 mg de ce dernier et 50 mg de $LiCl$, sont soumis à la dessalification dans les mêmes conditions; un dosage par l'acide périodique permet de retrouver la totalité de l'aminoalcool traité.

Dans l'une des expériences préliminaires, nous avons extrait par l'éther, le ou les aminoalcools éventuellement formés, cette extraction étant faite dans des conditions analogues à celles qui ont été décrites précédemment pour l'insuline. Le produit ainsi extrait, et repris par l'eau, a été chromatographié sur papier Whatman no 1 avec un mélange (en volumes): butanol 75 + acide acétique 7 + eau 18, en même temps que la plupart des aminoalcools correspondant aux acides aminés de l'ovomucoïde. Le chromatogramme obtenu montre une seule tache nette de R_F 0.60, fournie par la

solution provenant de l'ovomucoïde réduit. Cette tache se distingue nettement de celles des aminoalcools suivants, de R_F : sérinol 0.12, thréonol 0.14, colamine 0.15, aspartidiol 0.16, glutamidiol 0.19, alaninol 0.25, prolinol 0.30 et valinol 0.44; on peut donc dès maintenant affirmer qu'elle n'est due à aucun de ces aminoalcools. Cette tache est au contraire voisine des taches fournies par l'isoleucinol 0.56, le phénylalaninol 0.59 et le leucinol 0.61; il n'est donc pas possible de dire ici auquel ou auxquels de ces trois derniers aminoalcools doit être attribuée la tache obtenue à partir de l'ovomucoïde.

L'extraction par l'éther présente divers inconvénients, parmi lesquels d'une part le fait que cette opération n'est pas quantitative⁶, et d'autre part le fait qu'elle n'est pas absolument spécifique des aminoalcools; même lorsque les aminoacides sont sous forme de sels de baryum, et en milieu pratiquement anhydre, l'éther entraîne toujours une petite quantité de divers acides aminés, auxquels sont dues des taches faibles mais néanmoins visibles.

Pour effectuer une séparation quantitative des aminoalcools présents dans la solution déminéralisée, nous avons tout d'abord mis en oeuvre le caractère basique de ces substances qui, comme les acides aminés basiques, sont spécifiquement retenues sur une colonne de silice⁹.

Des expériences préliminaires nous ont en effet montré que, en l'absence de sels, 6 g de silice retiennent parfaitement les substances suivantes: arginine 4.5 mg + lysine 7.6 mg + histidine 2.7 mg (quantités qui correspondent à 100 mg d'ovomucoïde) + phénylalaninol 0.54 mg ou leucinol 0.42 mg. L'élution par HCl 0.1 N dans les conditions habituelles permet de récupérer quantitativement ces substances.

La solution déminéralisée est concentrée à 10 ml, ajustée à pH 7 et chromatographiée sur silice (6 g). On élimine les acides aminés neutres et acides de même que les sucres non aminés par lavage par 100 ml d'eau. On élue ensuite les substances adsorbées: acides aminés basiques, glucosamine et aminoalcools, par 100 ml de HCl 0.1 N. L'éluat est concentré sous vide jusqu'à 1 ml. Environ 0.1 ml est utilisé pour une chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 507 avec un mélange (en volumes): pyridine 35 + alcool *isoamyl*ique 35 + eau 27, en même temps que des quantités déterminées de phénylalaninol, de leucinol et d'isoleucinol. Un tel solvant présente en effet l'avantage de permettre une séparation convenable de ces trois derniers aminoalcools. Le chromatogramme obtenu (Fig. 1) permet d'observer trois taches groupées de R_F 0.02 à 0.04, et correspondant aux bases hexoniques, une tache de R_F 0.13 correspondant à la glucosamine et une tache de R_F 0.67; ce R_F est identique à celui de la tache correspondant au phénylalaninol; il diffère nettement de ceux du leucinol (0.61) et de l'isoleucinol (0.59). L'ovomucoïde a donc fourni par réduction une seule espèce d'aminoalcool, le phénylalaninol.

Pour isoler à l'état pur le phénylalaninol en vue de sa caractérisation certaine et de son dosage, nous avons effectué une deuxième séparation en mettant en oeuvre le caractère aromatique de cet aminoalcool qui, comme les acides aminés aromatiques, est spécifiquement adsorbé sur charbon (Activit 50 XP)⁹.

Bibliographie p. 556.

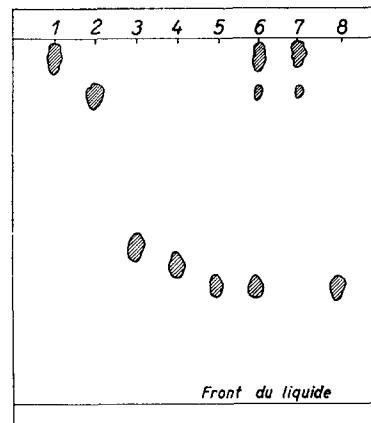


Fig. 1. 1. Acides aminés basiques; 2. Glucosamine; 3. Isoleucinol; 4. Leucinol; 5. Phénylalaninol; 6. Éluat de la silice; 7. Filtrat du charbon; 8. Éluat du charbon.

Des expériences préliminaires nous ont en effet montré que 100 mg de ce charbon, constituant une colonne de 2,5 mm de diamètre, retiennent en présence d'acide acétique à 5% au moins 0,54 mg de phénylalaninol sans fixer ni les acides aminés basiques, ni la glucosamine. L'élution du phénylalaninol ainsi adsorbé se fait quantitativement par l'eau saturée d'acétate d'éthyle⁹.

L'éluat concentré (0,9 ml) de la colonne de silice, débarrassé de l'excès d'acide chlorhydrique par évaporations successives, repris par une solution d'acide acétique à 5% (volume total environ 2 ml), et saturé d'hydrogène sulfuré, est versé sur une colonne de 100 mg de charbon; on lave la colonne par 3 ml d'acide acétique à 5% saturé d'hydrogène sulfuré, puis on élue par 8 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle et d'hydrogène sulfuré. Ce nouvel élutat est concentré sous vide presque à sec de façon à éliminer totalement l'hydrogène sulfuré et l'acétate d'éthyle, puis est amené par l'eau à 1 ml. On préleve 0,1 ml pour une chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 507 avec le mélange pyridine + alcool isoamylique + eau. On chromatographie sur le même papier le filtrat qui a été de son côté également concentré et amené à 1 ml. Le chromatogramme obtenu (Fig. 1) montre que l'isolement du phénylalaninol est excellent; c'est là une nouvelle preuve de l'identité de cet aminoalcool, caractérisé ici par son noyau aromatique.

III. Détermination quantitative

a. *Dosage par l'acide périodique.* La quantité de phénylalaninol formée a été déterminée tout d'abord par l'acide périodique, en utilisant des cellules de CONWAY¹⁰, et en dosant colorimétriquement l'ammoniac formé: on place dans la partie centrale de la cellule 1 ml d'une solution d'acide borique à 1%; dans la partie périphérique, on introduit, dans l'ordre suivant, une quantité voisine de 1 ml de la solution à analyser, qui doit renfermer entre 10 et 150 µg de phénylalaninol, 2 ml d'une solution de carbonate de potassium à 50%, et 1 ml d'une solution d'acide périodique 0,2 M. On ferme immédiatement la cellule, et on l'abandonne à 22° environ pendant 4 heures. Au bout de ce temps, on préleve quantitativement le liquide contenu dans la partie centrale de la cellule et on l'introduit dans un ballon jaugé de 5 ml. On ajoute 0,5 ml de réactif de NESSLER¹¹, on complète au trait et on fait une lecture photométrique sous 1 cm $\lambda = 400 \text{ m}\mu$, au spectrophotomètre de BECKMAN. Cette technique, appliquée à une fraction aliquote de l'élutat de la colonne de charbon, nous a montré que, dans la totalité de cet élutat, on avait recueilli 0,490 mg, soit 3,25 µmol, de phénylalaninol. Tenant compte de ce qu'on est parti d'une quantité de protéine correspondant à 14,85 mg d'azote total, et en admettant que la teneur en azote total de la protéine pure soit de 13,1% et que son poids moléculaire soit de 28,000, on voit que les 3,25 µmol de phénylalaninol trouvé, correspondent à 4,08 µmol d'ovomucoïde, soit 0,80 résidu de phénylalaninol par molécule d'ovomucoïde soumis à la réduction.

b. *Spectre d'absorption.* Le caractère aromatique du phénylalaninol doit se manifester chez cette substance par l'existence d'un spectre d'absorption ultra-violet dont on peut prévoir qu'il est analogue à celui de la phénylalanine¹². N'ayant trouvé dans la littérature aucune indication sur le spectre ultra-violet du phénylalaninol, nous avons mesuré ce spectre, au moyen du spectrophotomètre de BECKMAN, à partir de solutions de phénylalaninol $1 \cdot 10^{-3} M$, soit dans HCl 0,1 N, soit dans l'eau, soit dans NaOH 0,1 N. Les courbes obtenues sont représentées dans la Figure 2, dans laquelle nous indiquons également, à titre de comparaison, le spectre de la phénylalanine dans HCl 0,1 N.

Les six bandes d'absorption du phénylalaninol ainsi mises en évidence, dont les positions et les maxima sont précisés dans le Tableau II, sont assez voisines de celles

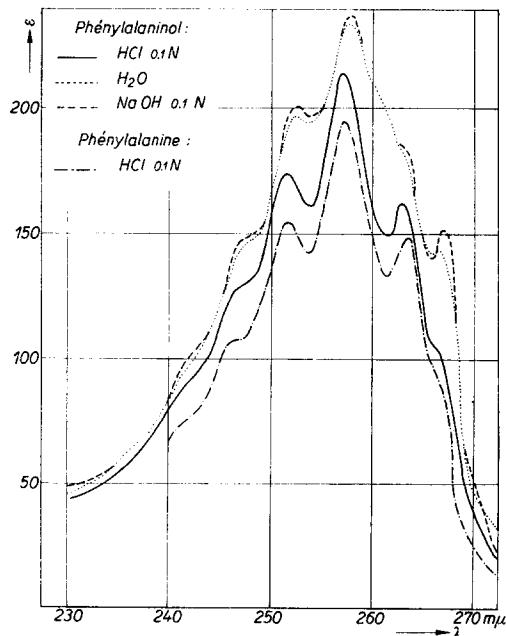


Fig. 2. Spectres ultra-violets du phénylalanol

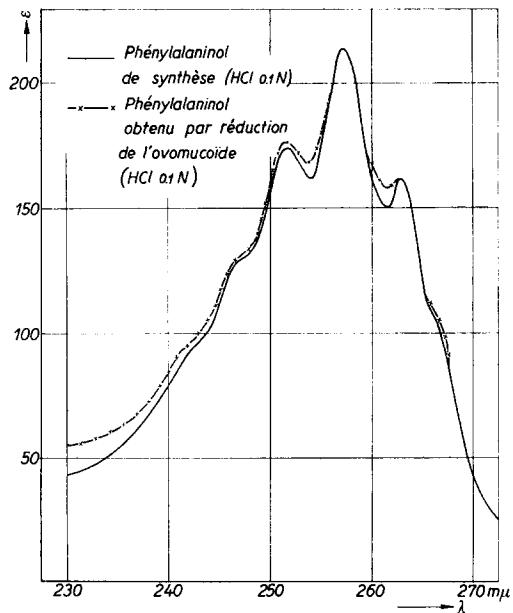


Fig. 3. Spectres ultra-violets du phénylalanol et de l'aminoalcool correspondant au groupe carboxylique terminal de l'ovomucoïde

de la phénylalanine; mais, comme on devait s'y attendre, alors que dans le cas de l'acide aminé il n'y a guère de différence entre le spectre de la solution acide et celui de la solution aqueuse, et qu'il y a une différence sensible entre le spectre de ces deux solutions et le spectre de la solution alcaline¹², pour l'aminoalcool, il n'y a guère de différente entre le spectre de la solution alcaline et le spectre de la solution aqueuse, et il existe une différence entre le spectre de ces deux solutions et celui de la solution acide.

Nous avons de même déterminé le spectre de la solution provenant de l'éluat du charbon: Une fraction aliquote de cet éluat, correspondant à 10.00 mg d'azote total, est évaporée à sec sous vide et repris par HCl 0.1 N, le volume total de la solution obtenue étant de 2.92 ml. La densité optique à $\lambda = 257.5$ m μ est de 0.167; à cette même longueur d'ondes, l'absorption moléculaire du phénylalanol est de 216. La concentration de l'aminoalcool dans la solution étudiée est donc $0.77 \cdot 10^{-3} M$. Cette valeur permet d'une part de calculer,

Bibliographie p. 556.

TABLEAU II
POSITION ET VALEUR DU MAXIMUM DES
BANDES D'ABSORPTION DU PHÉNYLALANOL

| Solvant | λ (m μ) | $\epsilon \cdot 10^{-2}$ |
|------------------|----------------------|--------------------------|
| HCl 0.1 N | 242 | 0.90 |
| | 247 | 1.28 |
| | 252 | 1.74 |
| | 257.5 | 2.15 |
| | 263 | 1.63 |
| | 266.5 | 1.04 |
| H ₂ O | 242 | 0.95 |
| | 247.5 | 1.45 |
| | 252.5 | 1.97 |
| | 258 | 2.35 |
| | 263.5 | 1.81 |
| | 267 | 1.44 |
| NaOH 0.1 N | 242 | 0.99 |
| | 247.5 | 1.48 |
| | 253 | 2.01 |
| | 258 | 2.39 |
| | 263.5 | 1.84 |
| | 267 | 1.52 |

comme on l'a fait plus haut, que le nombre de résidus de phénylalaninol par molécule d'ovomucoïde soumis à la réduction est de 0.82, chiffre en excellent accord avec celui trouvé par dosage chimique; elle permet d'autre part d'établir la courbe d'absorption moléculaire de la substance provenant de l'éluat du charbon, à partir de la courbe de la densité optique de la solution correspondante. On trouve ainsi le spectre de la Fig. 3, pratiquement identique à celui du phénylalaninol dans $HCl 0.1 N$ (Fig. 2). L'identité de l'aminoalcool résultant de la réduction de l'ovomucoïde est donc établie avec certitude. Il est également établi qu'une seule molécule de cet aminoalcool est formée par la réduction d'une molécule d'ovomucoïde: cette protéine ne contient ainsi qu'un groupe terminal carboxylique libre, à savoir un groupe appartenant à la phénylalanine.

Etant donné que les séparations par adsorption du phénylalaninol sont quantitatives, on doit, si le poids moléculaire de 28,000 indiqué pour l'ovomucoïde est exact, attribuer le fait que l'on trouve 0.8 résidu au lieu de 1.0 à une réduction qui, elle, n'est pas encore tout à fait quantitative; mais ce défaut d'environ 20% ne joue guère de rôle dans les conclusions du présent travail.

RÉSUMÉ

L'ovomucoïde ($N = 13.1\%$, P.M. = 28,000), a été réduit par $AlLiH_4$, puis hydrolysé. Par adsorption sur silice, puis sur charbon, on a extrait de l'hydrolysat un seul aminoalcool, le phénylalaninol. Ce dernier a été identifié par chromatographie sur papier, par son comportement au cours de sa chromatographie sur charbon, et par son spectre d'absorption dans l'ultra-violet. Ce spectre et le dosage par l'acide périodique, montrent que 0.8 mol de phénylalaninol sont formés par mol d'ovomucoïde soumis à la réduction. Il apparaît ainsi que l'ovomucoïde ne contient qu'un seul groupe terminal carboxylique libre, à savoir un groupe appartenant à la phénylalanine.

SUMMARY

Ovomucoid ($N = 13.1\%$, M.W. = 28,000) has been reduced by $AlLiH_4$, then hydrolysed. By adsorption on silica, then on charcoal, a single amino alcohol, phenylalaninol, has been extracted from the hydrolysate. This alcohol has been identified by paper chromatography, by its behaviour in the course of chromatography on charcoal, and by its ultraviolet absorption spectrum. The spectrum and the determination by periodic acid show that 0.8 mol phenylalaninol are formed per mol ovomucoid submitted to the reduction. It appears, therefore, that ovomucoid contains only a single free carboxylic end group, namely a group belonging to phenylalanine.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ovomucoid ($N = 13.1\%$, M.G. = 28,000) wurde mit $AlLiH_4$ reduziert und dann hydrolysiert. Durch Adsorption an Siliciumdioxyd und dann an Kohle wurde aus dem Hydrolysat ein einziger Aminoalkohol, das Phenylalaninol extrahiert. Diese Verbindung wurde durch Papierchromatographie, durch ihr Verhalten beim Chromatographieren an Kohle und durch ihr Absorptionspektrum im Ultravioletten identifiziert. Dieses Spektrum und die quantitative Bestimmung mit Perjodsäure zeigen, dass pro Mol Ovomucoid bei der Reduktion 0.8 Mol Phenylalaninol gebildet werden. Hieraus folgt, dass das Ovomucoid nur eine freie endständige Carboxylgruppe besitzt, nämlich die zum Phenylalanin gehörige.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSHMAN ET H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 23.
- 2 H. L. FEVOLD, *Adv. in Protein Chemistry*, 6 (1951) 188.
- 3 M. STACEY ET J. M. WOOLLEY, *J. Chem. Soc.*, (1940) 184; (1942) 550.
- 4 E. FREDERICQ ET H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 499.
- 5 H. FRAENKEL-CONRAT ET R. R. PORTER, *Biochem. J.*, 49 (1951) lxxviii.
- 6 CL. FROMAGEOT, M. JUTISZ, D. MEYER ET L. PÉNASSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 283.
- 7 H. LINEWEAVER ET C. W. MURRAY, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 565.
- 8 R. ACHER, M. JUTISZ ET CL. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 442.
- 9 CL. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- 10 E. J. CONWAY ET E. O'MALLEY, *Biochem. J.*, 36 (1942) 655.
- 11 *Handbook of Chemistry & Physics*, 30ème Ed., Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland 1947, p. 1345.
- 12 CL. FROMAGEOT ET G. SCHNEK, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 113.

Reçu le 8 avril 1952