

results are listed in Table I along with those obtained when the determination was carried out without this preliminary incubation.

TABLE I
DECOMPOSITION OF FAD IN COW AND SOW BLOOD

Period of incubation of blood and FAD (h)	O ₂ uptake in $\mu\text{l}/0.5 \text{ h}$			
	Sow blood		Cow blood	
0.0	76.0	78.5	82.5	79.0
0.5	4.5	5.8	3.9	3.2
1.5	—	—	1.5	2.1

From the figures listed in Table I it is apparent that *in vitro*, uncombined FAD is rapidly destroyed both in cow and sow blood. The complete absence of free FAD cannot however be assumed, for although no free FAD was detected by enzymic assay of 2 ml samples of blood from both species, the method, under the present conditions, could be expected to detect only amounts greater than $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$. The presence of FAD at concentrations considerably less than this could easily account for the amount found free in sow milk, and for a substantial part of the riboflavin of cow milk. Although free FAD was not detected in fresh blood, samples assayed after being heated at 95°C for 3 min yielded uptakes of oxygen equivalent to FAD concentrations of 0.43 and $0.63 \mu\text{g}/\text{ml}$ in cow and sow blood respectively. These figures presumably represent the concentrations of FAD combined with protein, and are in agreement with the values reported for ox blood by OCHOA AND ROSSITER⁸. No attempt has yet been made to characterise further the combined FAD from either source although it appears unlikely that either contains xanthine oxidase activity. This being so, the xanthine oxidase of cow milk would appear to arise by elaboration of the blood flavoproteins within the mammary gland during lactation, while sow blood, containing a similar concentration of flavoproteins, is not similarly converted.

The authors thank Miss F. KENNEDY and Miss M. LIGHTBODY for their technical assistance, and the Veterinary Investigation Officers of the West of Scotland Agricultural College for their help in obtaining samples of sow milk.

WILLIAM MANSON
V. V. MODI

Biochemistry Department, The Hannah Dairy Research Institute,
Ayr (Scotland)

- ¹ V. E. DAVIS, R. MACVICAR, C. B. ROSS, C. K. WHITEHAIR, A. A. HEIDERBRECHT, R. BRAUDE, M. E. COATES, K. M. HENRY, S. K. KON, S. Y. THOMPSON AND F. WILBY, *Nature*, 165 (1950) 522.
- ² V. V. MODI AND E. C. OWEN, *ibid.*, 178 (1956) 1120.
- ³ S. OCHOA AND R. J. ROSSITER, *Biochem. J.*, 33 (1939) 2008.
- ⁴ E. NEGELEIN AND H. BRÖMEL, *Biochem. Z.*, 300 (1939) 225.
- ⁵ L. C. CLARK, *J. Lab. Clin. Med.*, 37 (1951) 481.
- ⁶ J. L. CRAMMER, *Nature*, 161 (1948) 349.
- ⁷ H. B. BURCH, O. A. BESSEY, AND O. H. LOWRY, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 457.
- ⁸ R. ASCHAFFENBURG AND F. K. NEAVE, *J. Dairy Research*, 10 (1939) 485.
- ⁹ P. G. AVIS, F. BERGEL, R. C. BRAY, D. W. F. JAMES AND K. V. SHOOTER, *J. Chem. Soc.*, (1956) 1212.
- ¹⁰ C. A. ZITTLE, E. S. DELLAMONICA, J. H. CUSTER AND R. K. RUDD, *J. Dairy Sci.*, 39 (1956) 522.

Received March 13th, 1957

Sur les interactions de la lipase pancréatique avec les triglycérides

D'après WILLSTAETTER ET WALDSCHMIDT-LEITZ¹, la lipase pancréatique en solution aqueuse s'adsorbe partiellement sur une fine dispersion de tristéarine et se laisse ensuite éluer par le phosphate d'ammonium. Ce phénomène est intéressant car il peut servir à purifier la lipase et à mieux comprendre ses interactions spécifiques avec des substrats insolubles dans l'eau.

Des essais d'adsorption ont été effectués avec une préparation purifiée de lipase (préparation C₂* de notre précédente publication²). 300 mg de tristéarine en poudre ont été agités chaquefois

* Cette préparation est obtenue en précipitant 2 fois par Am_2SO_4 un extrait aqueux de pancréatine de porc.

pendant quelques minutes à 4–5° dans 5 ml d'une solution aqueuse contenant 20 mg de protéines et 300 unités-lipase. L'activité-lipase et les protéines restant en solution à la fin des essais ont été dosées de la façon habituelle². Les résultats sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

ADSORPTION DE LA LIPASE PANCRÉATIQUE PAR LA TRISTÉARINE

Chaque essai est réalisé dans un tampon 0.02 *M*. Ce tampon est de l'acétate entre pH 4.8 et 5.8, du phosphate à pH 7.0 et du véronal à pH 8.0.

pH	4.8	5.3	5.8	7.0	8.0
Lipase adsorbée (%)	47.0	40.5	37.5	33.0	29.0
Protéines adsorbées (%)	23.7	11.2	4.6	3.8	3.0

Les chiffres du Tableau I montrent que la tristéarine fixe effectivement une partie de la lipase. Une partie des protéines qui accompagnent la lipase dans la préparation C₂ est également adsorbée. L'adsorption non-spécifique de ces protéines diminue beaucoup quand le pH s'élève. Tout semble donc se passer comme si elle résultait de forces électrostatiques, les particules de tristéarine étant chargées négativement et fonctionnant en échangeurs de cations. Mais l'adsorption de la lipase, dont la charge nette est négative au-dessus de pH 5.5*, ne peut pas être expliquée par un échange d'ions de ce type. Il vaut mieux l'attribuer jusqu'à plus ample informé aux interactions spécifiques existant entre un enzyme et son substrat.

Le rendement de l'adsorption de la lipase sur la tristéarine est d'ailleurs mauvais. Nous n'avons pas pu l'améliorer, même en augmentant la surface utile de l'adsorbant par divers artifices**. De plus, contrairement aux assertions de WILLSTAETTER et WALDSCHMIDT-LEITZ, l'élution ultérieure de la lipase se fait très mal. Le rendement de cette élution est inférieur à 5 % quand on utilise diverses solutions salines de force ionique et de pH variés. Il ne dépasse pas 15 % avec des solutions diluées d'éthanol (dont le pouvoir dissociant vis à vis des complexes lipidiques est pourtant bien connu) et des solutions aqueuses saturées en chloroforme ou en oxyde d'éthyle.

L'emploi d'une émulsion d'huile à la place de tristéarine semble présenter deux avantages: (a) L'adsorption doit être améliorée car la lipase possède une plus grande affinité pour les glycérides liquides. (b) L'élution peut être recherchée en dissolvant ces glycérides à une température relativement basse dans un solvant convenable non-miscible à l'eau. Par contre, l'obligation où l'on est de centrifuger l'émulsion à un moment donné pour séparer sa phase aqueuse, exige que les globules de cette émulsion aient un diamètre à peu près uniforme et proche d'une valeur optimum. Si les globules sont trop gros, l'adsorption se fait mal et l'émulsion casse pendant la centrifugation. S'ils sont trop petits, une partie reste dans la phase aqueuse sous forme d'un fin brouillard et cette phase conserve fictivement une activité-lipase qui appartient en fait aux globules. Par suite de leur finesse même, qui augmente considérablement leur surface, ces globules peuvent contenir une proportion très appréciable de la lipase. Le diamètre des globules doit être compris entre 4 et 8 μ dans nos conditions expérimentales (stabilisation de l'émulsion par du Rhodoviol HS 100***; champ centrifuge de 4,000 g).

À l'aide d'un mixer à lames tournantes, on émulsifie pendant quelques minutes 10 g d'huile d'olive neutre dans 100 ml d'un tampon acétate 0.04 *M* à pH 5.8 contenant 0.1 % de Rhodoviol HS 100. On ajoute 1 ml de la solution de lipase (contenant 30 mg de protéines et 450 unités) à 5 ml de l'émulsion. On agite doucement à 40° pendant 5 min et on centrifuge à 4,000 *g* pendant 15 min. Les couches inférieures de la phase aqueuse sont parfaitement claires. On en prélève une partie à l'aide d'une seringue et on constate qu'elles sont complètement dépourvues d'activité-lipase. La quasi-totalité de l'activité se retrouve dans la crème surnageante. La phase aqueuse renferme 88–90 % des protéines de la préparation. On soutire cette phase à l'aide d'une seringue et on la remplace par une solution de NaCl à 15 %. Après agitation et centrifugation, on constate que la nouvelle phase aqueuse est, comme la première, totalement dépourvue d'activité. L'émulsion peut être ainsi lavée plusieurs fois. Mais, quand on ajoute un peu d'oxyde d'éthyle déperoxydé, l'émulsion casse aussitôt. La lipase passe alors intégralement dans l'eau. L'expérience est donc réversible. Mise en présence d'une émulsion de triglycérides, la lipase abandonne la phase aqueuse et vient se fixer solidement à l'interface. Elle regagne la phase aqueuse dès que l'émulsion disparaît.

La fixation de la lipase à l'interface correspond vraisemblablement à la formation banale du

* L'électrophorèse sur papier indique que le point isoélectrique de la lipase est voisin de 5.5 dans un tampon acétate *M*/20².

** En fixant par exemple une mince pellicule de tristéarine sur de l'hyflopercel siliconé.

*** Le Rhodoviol HS 100 est un alcool polyvinylique fabriqué par Rhône-Poulenc, rue Jean Goujon, Paris.

complexe enzyme-substrat. Mais le fait que dans le cas présent le substrat soit insoluble, nous suggère les quelques remarques suivantes: (a) Si, comme tout semble l'indiquer², la lipase est une protéine comme les autres enzymes, cette protéine doit avoir une structure spéciale permettant l'établissement de fortes interactions à l'interface. (b) L'existence d'interactions *in vitro* laisse d'autre part supposer que la lipase se fixe également dans l'intestin sur l'émulsion glycéridique en cours de digestion. Si, comme le veut la théorie de la résorption particulaire³, les globules de l'émulsion sont capables de traverser la muqueuse, il est concevable que la lipase les suive et soit par conséquent responsable de la resynthèse des triglycérides dans cette muqueuse. (c) Enfin, la présence permanente de la lipase à l'interface nous aide à comprendre comment l'enzyme réussit, malgré sa solubilité dans l'eau, à hydrolyser rapidement les triglycérides sans qu'il soit nécessaire d'agiter l'émulsion. Nos essais actuels de purification montrent que le "turnover" de l'enzyme à 37° et pH 8.0 est certainement supérieur à 10 fois son poids moléculaire. Il serait difficile d'admettre qu'un nombre aussi considérable de molécules de triglycérides puisse être hydrolysé par minute si l'habitat normal de la lipase était l'eau et si l'enzyme était obligé de venir se fixer à l'interface à chaque cycle réactionnel.

D'autres enzymes lipolytiques d'ailleurs paraissent capables de quitter la phase aqueuse en contractant des associations spécifiques avec leurs substrats insolubles. Le facteur clarifiant du sérum par exemple^{4,5} se fixe sur les chylomicrons. Le comportement exact de la phosphatidase A du pancréas vis à vis des phosphatides en émulsion n'est pas connu. Mais il semble que les interactions soient dans ce cas particulièrement fortes, puisque l'enzyme accompagne les phosphatides dans l'oxyde d'éthyle et poursuit leur hydrolyse au sein du solvant⁶. Nous pourrions donc bien nous trouver devant un mécanisme général, caractéristique de la biochimie des lipides et compensant dans une certaine mesure l'insolubilité gênante de ces substances dans l'eau.

Notons pour terminer que la fixation de la lipase sur les globules gras est maximum à un pH (pH 5.8) où la vitesse de la lipolyse proprement dite est nulle. Au pH habituel de la lipolyse (pH 8.0) la fixation sur l'émulsion (ainsi d'ailleurs que sur la tristéarine (Tableau I)) est moins intense. Une émulsion saturée en lipase à pH 5.8 abandonne à peu près 10 % de son activité quand elle est lavée par un tampon à pH 8.0. Il est donc vraisemblable que l'affinité de la lipase pour les triglycérides est plus grande en milieu acide, mais que le complexe lipase-triglycérides se décompose plus vite en milieu alcalin, grâce par exemple à la formation transitoire d'un dérivé acylé de l'enzyme, spontanément hydrolysable au-dessus de pH 7.

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

L. SARDA
G. MARCHIS-MOUREN
P. DESNUELLE

¹ R. WILLSTAETTER ET E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Z. physiol. Chem.*, 138 (1924) 247.

² L. SARDA, G. MARCHIS-MOUREN, M. J. CONSTANTIN ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 264.

³ A. C. FRAZER, *Physiol. Rev.*, 26 (1946) 103.

⁴ J. E. FRENCH, D. S. ROBINSON ET H. W. FLOREY, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 38 (1953) 101.

⁵ D. S. ROBINSON, G. H. JEFFRIES ET J. C. F. POOLE, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 40 (1955) 297.

⁶ D. J. HANAHAN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 199.

Reçu le 18 février 1957

Thaw rigor and the delta state of muscle

An isolated muscle fibre, stimulated to shorten by more than about one third of its initial length, enters the "delta state"; it does not return spontaneously to its original length, and after being re-extended, exerts less than the normal isometric tension on stimulation¹. Isolated muscles shorten reversibly by up to about 50% when stimulated, and by up to at least 70% when passing into the delta state². It has been suggested^{2,3} that irreversibility in the delta state is due to the rupture or tearing of transverse components of the sarcolemma.

We have recently examined certain features of "thaw rigor", the extreme shortening which occurs during the thawing of an isolated muscle previously frozen before the onset of rigor mortis^{4,5}. It is the purpose of this note to suggest a similarity between thaw-shortened muscle and muscle in the delta state.

Strips of lamb longissimus dorsi muscle, about 5 cm in length (along the fibre axis) and 0.25-0.5 sq.cm in cross-section, were placed in glass tubes and quickly frozen in solid carbon dioxide and alcohol (—70°). After at least an hour they were removed from the tubes and thawed on a glazed plate. The length and weight of each strip were recorded before thawing commenced and again after all physical changes were complete. Shortening values of 0-80% of the initial length