

VARIATIONS DU SPECTRE CYTOCHROMIQUE
DE LA LEVURE CULTIVÉE EN ANAÉROBIOSE EN FONCTION
DE SES PHASES DE CROISSANCE

THÉRÈSE HEYMAN-BLANCHET ET PAULETTE CHAIX

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

(Reçu le 15 Décembre, 1958)

SUMMARY

*Variations of the cytochromic spectrum of anaerobically grown yeast
as a function of its growth phases*

1. The reduced absorption spectrum of anaerobically grown yeast during its exponential-growth phase is characterized at -190° by three α bands at respectively 552.5 m μ , 558 m μ , and 574.5 m μ . This spectrum resembles the absorption spectrum at -190° of the microsomal fraction of the hepatic cell. Under the influence of oxygen the c and $(\alpha + \alpha_3)$ components are synthetized in a few hours; it is not possible to ascertain whether or not the c_1 and b components are identical with the corresponding anaerobic components.

2. At the end of the growth phase the components at 552.5 m μ and 558 m μ disappear and the component at 574.5 m μ shows a marked increase while two new components at $\alpha = 585$ m μ and $\alpha = 630$ m μ are detected in the spectrum. In this case oxygen induces within a few minutes the synthesis of the classical components of the aerobic spectrum, synthesis of the b and c_1 components preceding synthesis of the c and $(\alpha + \alpha_3)$ components.

INTRODUCTION

A basse température, la levure de boulangerie cultivée en anaérobiose stricte et récoltée pendant la phase exponentielle de sa croissance présente un spectre cytochromique caractérisé par 3 bandes α centrées respectivement à 552.5 m μ , 558 m μ et 574.5 m μ ¹. Nous avons recherché si ce spectre variait corrélativement aux phases de croissance comme cela se produit dans le cas d'une organisme aérobie strict tel que *B. subtilis*^{2, 3}. Cette étude a conduit à mettre en évidence chez la levure cultivée en anaérobiose et récoltée en phase stationnaire de croissance un spectre tout à fait différent de celui observé chez la levure récoltée au cours de la phase exponentielle.

De plus, nous avons étudié par nos méthodes spectrographiques à basse température de quelle façon se transforment ces deux types de spectres au cours de l'induction par l'oxygène des cytochromes respiratoires^{4, 5}.

Abréviations: μ = Taux de croissance: nombre de divisions cellulaires/h. U.C. = Unité de densité optique mesurée avec le photomètre de Coleman. λ = Longueur d'ondes. D.O. = Densité optique.

Bibliographie p. 93.

TECHNIQUES ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Souche

Saccharomyces cerevisiae "Yeast Foam", diploïde (aimablement communiqué par P. P. SLONIMSKI).

Milieu de culture

Milieu "à l'extrait de levure": pH = 6.0; "Yeast extract Difco" 10 g; KH_2PO_4 1 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 g; glucose anhydre 54 g; Tween 80* 160 mg; ergostérol** 20 mg; eau q.s.p. 1.000 ml.

Nous avons additionné nos milieux de culture de Tween 80 et d'ergotérol, substances favorisant la croissance des levures en anaérobiose d'après les observations de A. A. ANDREASEN ET T. J. B. STIER⁶.

Milieu synthétique: Les cultures sur le milieu "Basal No. 2" de A. A. ANDREASEN ET T. J. B. STIER⁷ ont donné une phase exponentielle de croissance très courte avec un taux de croissance $\mu = 0.4$. Il a été possible d'obtenir un meilleur taux de croissance et une phase exponentielle plus longue en faisant subir à ce milieu les modifications suivantes: la concentration du tampon succinate a été portée à 0.10 M au lieu de 0.05 M, celle du sulfate d'ammonium à 0.2 % au lieu de 0.7 %; la concentration du Tween 80 de 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et celle de l'ergostérol de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jugées optima par A. A. ANDREASEN ET T. J. B. STIER ont été portées respectivement à 1.120 et à 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$; de plus nous avons ajouté du mésoinositol.

Le milieu synthétique utilisé à propos de toutes les études spectrales décrites a la composition suivante:

Sels minéraux: KI 0.100 mg; H_3BO_3 0.500 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0.0625 mg; Na_2MoO_4 0.150 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.330 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.715 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0.500 mg; NaCl 0.1 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.132 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 g; KH_2PO_4 3 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g;

Vitamines: *d*-Biotine 0.016 mg; Pantothenate de calcium 3.2 mg; Nicotinamide 2.4 mg; Thiamine, HCl 1.6 mg; Pyridoxine, HCl 1.6 mg; Mésoinositol 8 mg.

Tween 80 1.120 g; Ergostérol 0.160 g; Tampon succinate pH 5.0 0.10 M; Glucose anhydre 100 g; Eau q.s.p. 1000 ml.

Conditions de culture

L'incubation se fait à 25° dans des récipients en verre Pyrex d'une capacité de 750 ml (Fig. 1) contenant 400 ml de milieu. L'air est éliminé de l'appareil par un barbotage d'azote R (azote contenant moins de 0.005 % d'oxygène) sous une pression de 4 cm de mercure, 1 h avant et 1 h après l'ensemencement. L'homogénéité continue du milieu est assurée par un agitateur magnétique.

Grâce à la tubulure latérale (a) du récipient, il est possible par aspiration à la trompe à eau de faire les prélèvements permettant d'établir les courbes de croissance. Les mesures de densité optique sont faites avec le photomètre Coleman. Une unité Coleman (U.C.) correspond à 17.1 μg de levure poids sec par ml.

La culture est ensemencée sous courant d'azote à partir d'un inoculum prélevé

* Polyoxyéthylène sorbitane monooléate.

** L'ergostérol est mis en pseudosolution dans le Tween 80.

pendant la phase exponentielle de croissance d'une culture anaérobie. La densité optique au temps zéro de l'incubation est environ égale à 0.15 U.C.

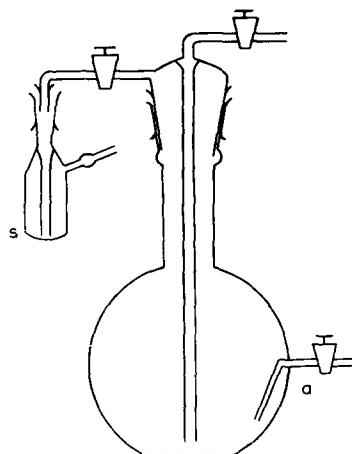


Fig. 1. Récipient utilisé pour les cultures anaérobies. S: soupape au mercure; a: tubulure permettant de faire des prélevements.

Conditions de récolte

Les cellules de levure sont récoltées par centrifugation à une température comprise entre 0° et + 4°. Pour éviter la présence de bulles de gaz carbonique dans les préparations servant à l'étude spectrographique la culture est additionnée avant centrifugation de fluorure de sodium 0.01 M. Il a été vérifié que le fluorure de sodium ne modifie pas la constitution des spectres cytochromiques.

Techniques spectrographiques

L'étude spectrale du culot de centrifugation des levures à l'état réduit est faite à la température de l'azote liquide suivant la technique précédemment décrite^{2,3}. Les composés hématiniques sont réduits par les substrats endogènes.

Conditions d'aération des suspensions de levures à l'état de "resting cells"

D'après la technique décrite par B. EPHRUSSI ET P. P. SLONIMSKI⁴, les cellules de levures sont récoltées et lavées 3 fois par centrifugation dans un tampon phosphate M/15 pH 4.6, puis le culot est mis en suspension dans le même tampon additionné de glucose 0.5 % et placé dans des récipients agités à raison de 130 oscillations/min et dans lesquels on maintient un barbotage d'air; toutes ces opérations sont réalisées stérilement.

Préparation des hémostichromes de pyridine

50 ml d'une suspension de levure à 4 % sont centrifugés 5 min à 5,000 rev./min. Le culot est repris avec 5 ml d'eau distillée et additionné de 500 mg d'hydrosulfite de sodium, puis après 3 min, de 1.5 ml de pyridine pure. Le mélange est maintenu en contact pendant 3 min, puis est additionné de 25 ml d'eau distillée et centrifugé 10 min à 5,000 rev./min. L'examen spectrographique est fait sur le culot ainsi obtenu.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

*Évolution du spectre en fonction des phases de croissance de la levure cultivée en anaérobiose stricte**Cultures sur milieu à l'extrait de levure*

La courbe de croissance est donnée dans la Fig. 2 (courbe I).

Spectre de levures récoltées en phase exponentielle de croissance: D.O. = 64 U.C.

Comme le montre la courbe 1 de la Fig. 3, le spectre des bandes α est caractérisé par 3 bandes à $552.5 \text{ m}\mu$, $558 \text{ m}\mu$, et vers $574.5 \text{ m}\mu^1$.

Spectres de levures récoltées après la phase exponentielle de croissance: (a) D.O. = 102 U.C.: spectre 2 de la Fig. 3. On retrouve les 3 bandes α observées au cours de la phase exponentielle mais la bande à $574.5 \text{ m}\mu$ a une importance relative plus grande.

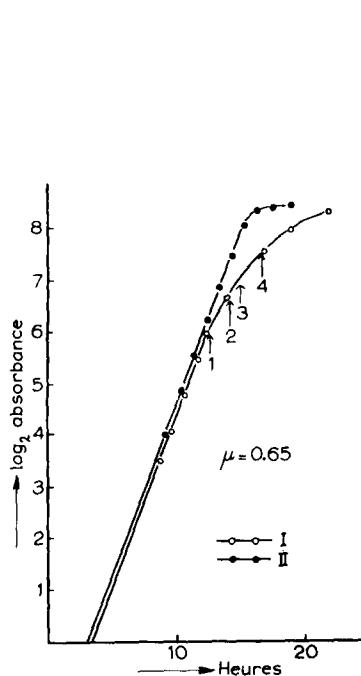


Fig. 2. Courbes de croissance de la levure cultivée en anaérobiose stricte sur les milieux à base d'extrait de levure: I, Ergostérol 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Tween 80 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$; II, Ergostérol 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Tween 80 1.120 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les flèches indiquent les densités optiques atteintes par les cultures effectuées en vue d'étudier l'évolution des spectres. 1 - D.O. = 64 U.C.; 2 - D.O. = 102 U.C.; 3 - D.O. = 120 U.C.; 4 - D.O. = 178 U.C.

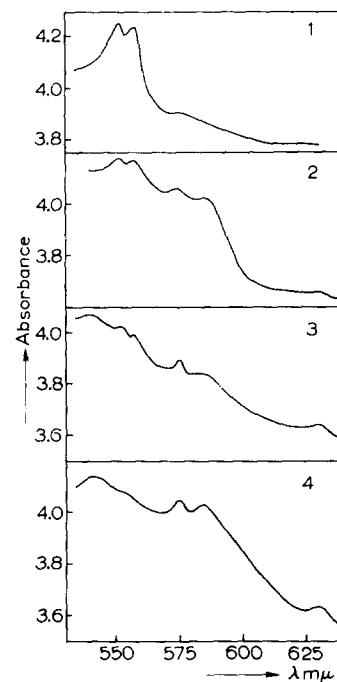


Fig. 3. Évolution du spectre hématinique de la levure cultivée en anaérobiose sur milieu à l'extrait de levure en fonction des phases de croissance. Densité optique de la culture au moment de la récolte. 1 - D.O. = 64 U.C.; 2 - D.O. = 102 U.C.; 3 - D.O. = 120 U.C.; 4 - D.O. = 178 U.C.

De plus apparaissent deux nouvelles bandes α assez faibles: l'une située à $585 \text{ m}\mu$ déjà observée par A. LINDENMAYER ET L. SMITH⁸ et l'autre située à $630 \text{ m}\mu$, (b) D.O. = 120 U.C.: spectre 3 de la Fig. 3. L'importance relative des différentes bandes α a encore évolué; les bandes situées à $552.5 \text{ m}\mu$ et à $558 \text{ m}\mu$ s'affaiblissent; les autres bandes s'accentuent et il apparaît une nouvelle bande à $540 \text{ m}\mu$. (c) D.O. =

158 U.C. : spectre 4 de la Fig. 3. Les bandes situées à $552.5\text{ m}\mu$ et $558\text{ m}\mu$ ont pratiquement disparu et les 4 autres bandes se sont nettement accentuées.

Le milieu utilisé dans ces expériences donne un taux de croissance $\mu = 0.65$ pendant une phase exponentielle relativement courte. Le taux de croissance diminue très lentement avant que soit atteinte la phase stationnaire. Dans ces conditions, il est possible d'effectuer plusieurs récoltes de levures entre la phase exponentielle et la phase stationnaire et d'observer ainsi d'une façon précise le passage d'un type de spectre à l'autre.

Si ce milieu est additionné d'une plus grande quantité de Tween 80 et d'ergostérol le taux de croissance ne varie pas mais la phase exponentielle est plus longue et il y a passage brusque de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Fig. 2, courbe II), conditions très peu propices à l'analyse de l'évolution du spectre.

Cultures sur milieu synthétique

La courbe de croissance sur le milieu optimum est donnée dans la Fig. 4. L'étude spectrale à basse température montre que le spectre de la phase exponentielle est le même que dans le cas de la levure cultivée sur milieu à l'extrait de levure. La phase

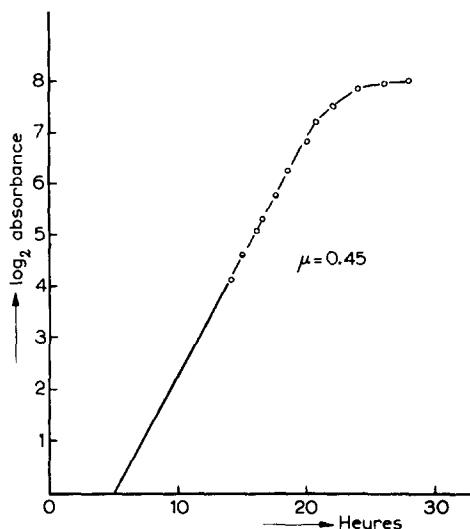


Fig. 4. Courbe de croissance de la levure cultivée en anaérobiose stricte sur milieu synthétique.

intermédiaire étant beaucoup plus courte sur le milieu synthétique, il est difficile de récolter pendant cette période. Durant la phase stationnaire, il semble que les levures soient moins riches en pigment que celles cultivées sur le milieu à l'extrait de levure. Quoi qu'il en soit, on retrouve dans le cas des levures cultivées sur milieu synthétique la même évolution du spectre que celle représentée sur la Fig. 3 dans le cas des levures cultivées sur milieu à l'extrait de levure.

Remarques

(1) Il a été vérifié que l'on obtient les mêmes spectres avec des inoculum provenant d'une culture issue de 5 repiquages en anaérobiose stricte. (2) L'hypothèse d'une

éventuelle induction par l'oxygène des cytochromes au cours de la récolte faite à une température voisine de $+4^\circ$ en présence d'air, peut être rejetée d'après l'expérience suivante: le récipient de culture est muni latéralement d'une cuve à faces parallèles (diamètre intérieur = 8 mm) en plexiglas. Cette cuve est adaptée au ballon après stérilisation à l'aide d'un petit tuyau en caoutchouc à vide. Après des temps d'incubation convenablement choisis, on peut immobiliser le ballon dans une position telle que les levures se décentrent dans cette cuve qui peut être ensuite détachée du ballon et plongée dans l'azote liquide pour l'examen spectroscopique. Le spectre observé dans ces conditions à -190° est le même que celui observé sur des prélevements. (3) Les cultures habituellement effectuées en atmosphère d'azote ont été faites aussi en atmosphère de CO_2 pur pour examiner l'influence de la pression partielle de CO_2 sur le spectre hématinique de la phase exponentielle. En atmosphère de CO_2 , sur milieu à l'extrait de levure, le taux de croissance est égal à 0.5 et l'évolution du spectre est la même qu'en atmosphère d'azote. (4) Si l'on abaisse le taux de croissance soit en modifiant la composition du milieu, soit en abaissant la température d'incubation à 12° , on ne constate aucune modification du spectre de la phase exponentielle entre $\mu = 0.05$ et $\mu = 0.5$. (5) Bien que le milieu de culture synthétique utilisé soit tamponné par le succinate, le pH initialement de 5.0 peut s'abaisser jusqu'à 4.4. Les variations du spectre hématinique ne sont pas dues à ce changement de pH car on observe la même évolution chez une culture dont le pH initial est égal à 4.4. (6) L'hémochrom de pyridine correspondant à celui du protohème (bande α unique à $555 \text{ m}\mu$ à -190°) quel que soit le stade d'évolution du spectre.

Induction du système cytochromique respiratoire classique par l'oxygène de l'air

D'après les expériences de P. P. SLONIMSKI^{4,5} il est possible d'induire très rapidement la synthèse du système cytochromique respiratoire (caractérisé à basse température par les bandes ($\alpha + \alpha_3$) α , ba , $c_1\alpha$ et ca) en mettant en contact avec de l'air des cellules de levure ("resting cells") récoltées en phase stationnaire de croissance anaérobiose. L'induction des systèmes respiratoires est pratiquement nulle si les levures sont récoltées pendant la phase exponentielle de croissance anaérobiose sur un milieu contenant NH_4^+ comme source d'azote, mais elle devient possible si elle a lieu en présence d'acides aminés⁶. Ces expériences ont été faites quand on supposait que la levure cultivée en anaérobiose ne présentait qu'un seul type de spectre hématinique. Il a paru à propos de les répéter en contrôlant à basse température le type du spectre des levures mises en jeu.

Nos expériences confirment que l'induction du système respiratoire est beaucoup plus rapide en phase stationnaire qu'en phase exponentielle. La Fig. 5 relative à l'induction du système respiratoire chez des levures récoltées en phase stationnaire de croissance sur milieu à l'extrait de levure indique que l'induction débute par l'apparition de bandes situées vers $552.5 \text{ m}\mu$ et $558 \text{ m}\mu$. Cette induction progresse rapidement après 35 min, 1 h 10 et 3 h d'aération; elle évolue de la même façon quand il s'agit de levures cultivées sur milieu synthétique.

La Fig. 6 donne l'évolution de l'induction par l'oxygène de levures cultivées soit sur milieu à l'extrait de levure (Fig. 6, A), soit sur milieu synthétique (Fig. 6, B) et récoltées pendant la phase exponentielle de croissance: les bandes situées à $552.5 \text{ m}\mu$ et à $558 \text{ m}\mu$ ne disparaissent pas; l'induction est relativement lente dans le cas des

levures cultivées sur milieu à l'extrait de levure et elle est pratiquement nulle après 5 h d'aération dans le cas des levures cultivées sur milieu synthétique.

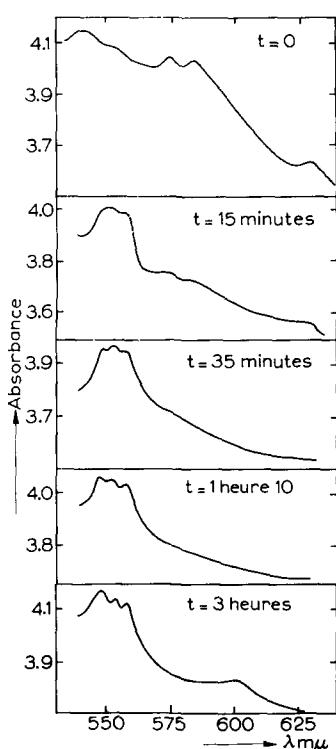


Fig. 5

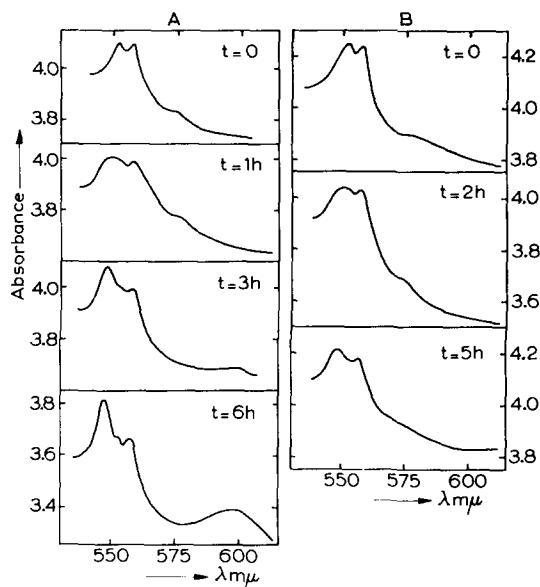


Fig. 6

Fig. 5. Induction du système cytochromique respiratoire par l'oxygène de l'air dans le cas de levures à l'état de "resting cells" provenant de cultures sur milieu à l'extrait de levure, en anaérobiose et récoltées en phase stationnaire de croissance. Densité optique de la culture au moment de la récolte = 240 U.C.

Fig. 6. Induction du système cytochromique respiratoire par l'oxygène de l'air dans le cas de levures à l'état de "resting cells" provenant de cultures en anaérobiose et récoltées en phase exponentielle de croissance. A - Culture sur milieu à l'extrait de levure. Densité optique de la culture au moment de la récolte = 32 U.C. B - Culture sur milieu synthétique. Densité optique de la culture au moment de la récolte = 35 U.C.

DISCUSSION

Nos expériences ont mis en évidence spectrographiquement l'existence de composés hématiniques apparaissant dans un ordre bien défini au cours des différentes phases de croissance de la levure cultivée en anaérobiose. Les spectres d'absorption étudiés sont susceptibles de subir des transformations bien définies aboutissant au spectre classique de la levure cultivée en aérobiose quand on fait intervenir l'oxygène moléculaire.

Composantes hématiniques de la phase exponentielle de croissance anaérobiose

Il est frappant de constater tout d'abord que le spectre de la phase exponentielle de croissance anaérobiose caractérisé, à la température de l'azote liquide par 3 bandes α : 552.5 mμ, 558 mμ et 574.5-575 mμ, ressemble au spectre de la fraction microsomique de la cellule hépatique^{10, 11}. Dans les deux cas on retrouve les deux bandes (552.5 mμ

et $558 \text{ m}\mu$) qui, à la température ordinaire, apparaissent sous forme d'une bande unique antérieurement décrite comme étant le cytochrome anaérobie de la levure⁴ et comme étant le cytochrome b_5 de la cellule hépatique^{12,13}; dans les deux cas on retrouve aussi la bande à $574.5-575 \text{ m}\mu$. Dans les microsomes PAIGEN¹⁴ attribue cette dernière bande à de l'oxyhémoglobine, sans oser affirmer qu'il ne s'agit pas d'une contamination provenant de l'hémoglobine des globules rouges qui se serait adsorbée sur les microsomes au cours du fractionnement cellulaire. PAIGEN suppose que cette composante est de l'oxyhémoglobine parce qu'elle disparaît en présence d'hydrosulfite. Il convient de remarquer toutefois que cette bande subsiste quand la cellule hépatique entière est réduite par le succinate¹¹. Dans le cas de la levure anaérobie, l'hypothèse d'une contamination par de l'hémoglobine est évidemment exclue; il s'agit d'une composante hématinique n'intervenant pas dans les systèmes cellulaires respiratoires.

Indépendamment de toute division cellulaire, l'oxygène provoque chez les levures anaérobies récoltées en phase exponentielle de croissance et utilisées à l'état de "resting cells" la transformation du spectre anaérobie en spectre aérobie classique. La synthèse des cytochromes c ($\alpha = 548 \text{ m}\mu$) et $a + a_3$ ($\alpha = 600 \text{ m}\mu$) est apparente après quelques heures d'aération. Les bandes c_1a et ba occupent les mêmes positions que les deux composantes anaérobies caractérisées par les bandes a à 552.5 et $558 \text{ m}\mu$. La question se pose dès lors de savoir si à ces longueurs d'ondes se superposent les composantes c_1 et b et les composantes anaérobies ou si les composantes c_1 et b ne sont pas identiques aux composantes anaérobies.

Composantes hématiniques de la phase stationnaire de croissance anaérobie

Corrélativement au ralentissement et à l'arrêt de la multiplication cellulaire et par conséquent à l'arrêt des synthèses anaérobies, les bandes $a = 552.5 \text{ m}\mu$ et $558 \text{ m}\mu$ (Fig. 3) s'atténuent et disparaissent; au contraire, la bande $a = 574.5 \text{ m}\mu$ s'accentue. En même temps apparaissent les composantes caractérisées par les bandes a à $585 \text{ m}\mu$ et $630 \text{ m}\mu$ difficilement rattachables jusqu'ici à des composantes connues. Il ne semble pas exister de corrélation entre l'intensité de la bande $a = 630 \text{ m}\mu$ et l'activité catalasique; l'activité catalasique de la levure anaérobie en phase stationnaire de croissance est d'ailleurs extrêmement réduite.

RÉSUMÉ

1. Le spectre hématinique réduit de la levure récoltée pendant la phase exponentielle de croissance anaérobie est caractérisé à -190° par 3 bandes a situées à $552.5 \text{ m}\mu$, $558 \text{ m}\mu$ et $573.5 \text{ m}\mu$. Il ressemble au spectre (à -190°) de la fraction microsomique de la cellule hépatique. L'intervention de l'oxygène détermine en quelques heures la synthèse des composantes c et $(a + a_3)$; il n'est pas possible de dire si les composantes c_1 et b sont identiques ou non aux composantes anaérobies.

2. Quand la multiplication cellulaire est terminée, les composantes situées à $552.5 \text{ m}\mu$ et $558 \text{ m}\mu$ disparaissent et la composante $574.5 \text{ m}\mu$ s'accentue en même temps qu'apparaissent deux composantes nouvelles: $a = 585 \text{ m}\mu$ et $a = 630 \text{ m}\mu$. Dans ce cas l'oxygène provoque en quelques minutes la synthèse des composantes du spectre aérobie classique; la synthèse des composantes b et c_1 précède celle des composantes c et $(a + a_3)$.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. CHAIX ET T. HEYMAN-BLANCHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 214.
- 2 P. CHAIX ET J. F. PETIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 66.
- 3 P. CHAIX ET J. F. PETIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 481.
- 4 B. EPHRUSSI ET P. P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- 5 P. P. SLONIMSKI, *Thèse Sciences*, Paris, 1952.
- 6 A. A. ANDREASEN ET T. J. B. STIER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 41 (1953) 23.
- 7 A. A. ANDREASEN ET T. J. B. STIER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 43 (1954) 271.
- 8 A. LINDENMAYER ET L. SMITH, *Federation Proc.*, 16 (1957) 212.
- 9 P. P. SLONIMSKI, *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, Brussels, 1956, p. 242.
- 10 P. CHAIX, R. MONIER, J. F. PETIT ET F. ZAJDELA, *Compt. rend.*, 246 (1958) 328.
- 11 P. CHAIX, J. F. PETIT, R. MONIER ET F. ZAJDELA, *Bull. soc. chim. biol.*, fascicule à la mémoire du Professeur C. Fromageot, 40 (1958) 1897.
- 12 C. F. STRITTMATTER ET E. G. BALL, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 43 (1954) 57.
- 13 B. CHANCE ET G. H. WILLIAMS, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 945.
- 14 K. PAIGEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 297.

STUDIES ON THE STRUCTURE OF HEMOGLOBIN

II. PROPERTIES OF RECONSTITUTED PROTOHEMOGLOBIN AND
PROTOPORPHYRIN-GLOBIN

A. ROSSI-FANELLI, E. ANTONINI AND A. CAPUTO

*Institute of Biochemistry of the University and
"Regina Elena" Institute for Cancer Research, Rome (Italy)*

(Received December 20th, 1958)

SUMMARY

Human hemoglobin has been reconstituted from protohematin and pure native globin.

The reconstituted Hb was the same as the natural pigment in its physico-chemical properties (absorption spectra, isoelectric point, electrophoretic behaviour, sedimentation, diffusion, stability to heat and alkali) and in its oxygen equilibrium (heme-heme interaction, BOHR effect, oxygen affinity). The compound of globin with protoporphyrin was also obtained and investigated. The molecular properties of this protoporphyrin-globin are very similar to those of hemoglobin.

INTRODUCTION

In the previous paper¹ of this series, we described the preparation and properties of pure human globin. The study of the properties of reconstituted products of native globin with different prosthetic groups can give important information on the structure of hemoglobin, on the linkages and on the arrangement of hemes in this pigment. In the present paper, the reconstitution of protohemoglobin and protoporphyrin-globin is described and some of the structural properties of these reconstituted pigments are reported.

References p. 101.