



Chromatogram showing amino acids of healthy and 'Carica-curl' infected leaves of *Carica papaya* (Solvent: But. - Acetic Acid - Water) 4 : 1 : 5

A and D—Reference solutions; CHA—Alcoholic extract of healthy leaves; CCA—Alcoholic extract of 'Carica-curl' infected leaves; CpHA—Alcoholic extract of healthy petiole; CpCA—Alcoholic extract of 'Carica curl' infected petiole; CHH—Acid hydrolysate of healthy leaves; CCH—Acid hydrolysate of 'Carica-curl' infected leaves.

was established by running the chromatogram with McFARREN's technique<sup>6</sup>.

The acid hydrolysate of both the healthy and 'carica-curl' infected leaves show the presence of the following common amino acids: leucines + phenylalanine (Rf 0.87; 1 and 2), valine + methionine (Rf 0.75; 3), tyrosine (Rf 0.73; 4), alanine (Rf 0.57; 5), glutamic acid + threonine (Rf 0.50; 6), glycine + aspartic acid (Rf 0.44; 7), arginine (Rf 0.38; 8) and histidine + lysine (Rf 0.32; 9). A decrease in the intensity of the bands is observed in the hydrolysate of 'carica-curl' infected leaves as compared to healthy leaves.

Such an increased formation of asparagine and  $\beta$ -alanine +  $\alpha$ -aminobutyric acid may be either due to the breakdown of the insoluble leaf protein or through some other unknown metabolic process, induced by virus infection.

We are grateful to Prof. SHRI RANJAN for his valuable guidance and interest in the work. We wish to thank SHRI K. S. BILGRAMI for his valuable help.

M. M. LALORAYA, GOVINDJEE,  
RAJNI VARMA, and T. RAJARAO

Department of Botany, University of Allahabad, India,  
October 19, 1955.

#### Zusammenfassung

Mit Hilfe der Papierchromatographie wurden lösliche und unlösliche Proteine in gesunden und durch «Carica-Curl»-Virus erkrankten Blättern von Carica-Papaya bestimmt. In kranken Blättern nehmen die unlöslichen Proteine ab, der Gehalt an Asparagin,  $\beta$ -Alanin +  $\alpha$ -Aminobuttersäure zu, was wohl auf eine Änderung des Eiweißstoffwechsels der infizierten Blätter unter dem Einfluss des Virus zurückgeführt werden darf.

#### Sur l'interaction entre aldéhydes ou réductones et acides aminés ou protéines

##### IV. Dosages des groupements basiques des protéines traitées à l'acétaldéhyde ou au glucose

Les propriétés physicochimiques des protéines subissant la réaction de Maillard (brunissement non-enzymatique des protéines en présence de sucres réducteurs), changent d'une façon progressive au cours de la réaction. Leur poids moléculaire augmente, la solubilité diminue, la polydispersion du produit s'accroît, ce qui peut être mis en évidence par l'électrophorèse et ultracentrifugation<sup>1</sup>. En dehors de son importance bromatologique, cette réaction mérite l'intérêt des biochimistes, car il n'est pas impossible que la combinaison *in vivo* du glucose (ou d'autres substances de nature aldéhydrique) et des groupements basiques des protéines sériques et tissulaires joue un rôle physiologique. L'étude d'un tel problème nécessite avant tout une méthode permettant de suivre les modifications des protéines. La modification primaire des protéines étant le blocage de ses groupements basiques, nous avons essayé d'appliquer la méthode de FRAENKEL-CONRAT et COOPER<sup>2</sup> au dosage des groupements basiques des protéines avant et après traitement à l'acétaldéhyde ou au glucose<sup>3</sup>.

Le Tableau suivant donne les résultats de ces dosages.

<sup>1</sup> A. MOHAMMED, H. FRAENKEL-CONRAT et H. S. OLCOTT, Arch. Biochem. 24, 157 (1949). – L. ROBERT et F. S. PENARANDA, J. Polymer. Sci. 12, 337 (1954). – M. POLONOVSKI et L. ROBERT, Exper. Med. Surg. 12, 68 (1954).

<sup>2</sup> H. FRAENKEL-CONRAT et M. COOPER, J. biol. Chem. 154, 239 (1944).

<sup>3</sup> Cette méthode consiste en la mesure spectrophotométrique de la combinaison entre les protéines et un colorant acide (orange G) à pH 2,0, la quantité de colorant fixé étant fonction du nombre des groupements basiques.

<sup>6</sup> EARL F. MCFARREN, Anal. Chem. 23, 168 (1951).

Dosage des groupements basiques des protéines avant et après traitement au glucose ou à l'acétaldéhyde

Protéine	Groupements basiques en $\frac{\text{équivalent g}}{10^4 \text{ g protéine}}$			Rapport C/N dans la protéine	
	Valeur théorique <sup>1</sup>	Valeur trouvée pour la protéine		avant traitement	après traitement
		avant traitement	après traitement		
Sérum albumine de cheval . . . . .	13,8-14,3	11,5	5,88 <sup>2</sup>		
Sérum humain <sup>3</sup> . . . . .		12,3			
		11,9	12,1 <sup>4</sup>		
		11,7			
Sérum-albumine de bœuf . . . . .	7,6- 9,4	16,85	14,36 <sup>5</sup>	2,96	3,79
Caséine <sup>6</sup> . . . . .		8,06	8,88 <sup>5</sup>	3,46	3,29
Gélatine . . . . .		8,9-10,7	10,15	2,69	
Fibrine . . . . .		13,0	14,46 <sup>5</sup>	3,04	3,03
Edestine . . . . .	12,8-14,1	17,8		2,60	2,50
Elastine <sup>7</sup> . . . . .	0,77-1,08	0,5	0,29 <sup>5</sup>	3,23	3,22

<sup>1</sup> Chiffres extrêmes obtenus par différents auteurs et par des méthodes diverses [E. J. COHN et J. T. EDSALL, *Proteins, Amino-acids and Peptides* (Reinhold Publ., 1943), p. 354].

<sup>2</sup> Incubation de la protéine (solution aqueuse 5 par 100) avec une solution de glucose 1 M (2 moles par équivalent de groupement basique), à 38° pendant 2 jours.

<sup>3</sup> Les valeurs pour le sérum sont exprimées en *m Eq.* de groupement basique pour 100 ml de sérum.

<sup>4</sup> 3 ml de sérum sont incubés avec 0,3 ml de glucose à 43% pendant 24 h à 37° (~ 2 moles de glucose par équivalent de groupement

basique).

<sup>5</sup> Sérum-albumine, caséine, gélatine, fibrine, édestine, et élastine sont exposées à état sec à des vapeurs d'acétaldéhyde, sous une cloche à 18-20°, à une humidité relative de 65-70%, pendant 10 jours, puis séchées sous vide phosphorique et par la méthode thermogravimétrique [C. DUVAL et L. ROBERT, *C. r. Acad. Sci.* 238, 282 (1954)].

<sup>6</sup> Caséine de MERCK, purifiée selon HAMMARSTEN.

<sup>7</sup> L'élastine est préparée à partir de média d'aorte de bœuf selon la méthode de I. BANGA, *Acta physiol. Hungar.* 3, 317 (1952).

On voit qu'en dehors de la sérum-albumine et de l'élastine, la teneur apparente en groupements basiques des protéines n'est pas diminuée au cours de la réaction, bien que dans le cas de l'acétaldéhyde la formation de résines aldéhydiques soit abondante avec toutes les protéines. Ces constatations sont en accord avec les résultats de STRAIN<sup>4</sup>, qui ne trouve pas de diminution des groupements basiques pour l'alanine traitée ou non au glucose, en employant la méthode titrimétrique de LINDERSTRÖM-LANG<sup>5</sup>. Ceci s'explique si on admet que la glucosylamine initialement formée, donne naissance au cours de la réaction à des bases secondaires ou tertiaires, dont le *pK* est assez élevé pour être titré par le colorant à pH 2,0, où on opère.

Le comportement exceptionnel de la sérum-albumine, confirmé par les dosages élémentaires (rapport C/N augmenté) et le dosage de la résine aldéhydique formée sur la protéine<sup>6</sup>, démontre une fois de plus la réactivité particulière de cette protéine, qui forme facilement des complexes avec des anions, des cations et des molécules non chargées. La combinaison du glucose avec la sérum-albumine est lente, en comparaison avec la réactivité du glucose avec les acides aminés qu'on peut suivre par titrimétrie selon la méthode de KATCHALSKY et SCHARON<sup>7</sup>. KEPES n'a pas trouvé de combinaison entre glucose et sérum-albumine dans les premières heures de contact, par la méthode de dialyse de KLOTZ<sup>8</sup>. La dénaturation préalable des protéines ne semble pas accélérer la combinaison. Ceci a été démontré par l'application de la méthode de KATCHALSKY à des mélanges sérum-glucose: on mesure l'abaissement de pH au cours de la réaction, cet abaissement étant proportionnel à la

combinaison du glucose avec les groupements basiques des protéines. Le titrage continu de ces mélanges n'a pas été pratiquable à cause de la lenteur de la réaction.

La variation du pH d'un sérum humain normal incubé 2 jours à 37° sous toluène avec du glucose (4 mM pour 2 ml de sérum) est de -2,27 unités (contrôle sans glucose + 0,23); le même sérum dénaturé par 0,4 g d'urée donne une variation de pH de -2,24 (contrôle sans glucose + 0,55), en présence de 1 mg de zéphirrol le pH variant de -1,99 unités (contrôle sans glucose + 0,02). Signalons enfin la constance de la teneur en groupements basiques protéidiques des sérums examinés, propriété qui a été mise à profit par COURTOIS et BARRÉ<sup>9</sup> pour l'utilisation du dosage des groupements basiques des protéines sériques en clinique. Des variations importantes sont obtenues au cours de certaines maladies.

VERA BAJIC, L. ROBERT et  
J. POLONOVSKI

*Service de Chimie, Faculté de Médecine, Paris, le 28 septembre 1955.*

#### Summary

Proteins were exposed to acetaldehyde vapour or mixed with glucose in solution and the basic groups determined by their dy binding capacity. Only serum albumin shows a marked decrease of basic groups and of the carbon/nitrogen ratio as a sign of condensation of aldehyde and amine groups. These results were corroborated by the direct estimation of the aldehyde residue formed on the protein: serum albumin and fibrin treated with acetaldehyde vapour contained 5 to 10 times more resin than the other proteins examined. No rapid combination between serum proteins and glucose could be demonstrated by the dy method or by the kinetics of change of pH. The slow reaction seems not to be dependent on denaturation.

<sup>4</sup> G. JOHANSEN et W. J. NICKERSON, *Res. Com. 1<sup>er</sup> Congr. Int. Bioch.* Cambridge 1949, p. 223.

<sup>5</sup> H. H. STRAIN, *C. r. Lab. Carlsberg Ser. Chim.* 23, 159 (1940).

<sup>6</sup> L. ROBERT et V. BAJIC (en préparation).

<sup>7</sup> A. KATCHALSKY et N. SCHARON, *Biochim. biophys. Acta* 10, 290 (1953).

<sup>8</sup> A. KEPES (communication personnelle).

<sup>9</sup> J. COURTOIS et R. BASSÉ, *Bull. Soc. Chim. biol.* (1955) (sous presse).