

trennung des ausgeschiedenen Silberbromids wurde das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation entfernt und das gelbe, ölige Reaktionsprodukt (71 g) direkt weiter verarbeitet.

*1-Amino-5-nitro-pentan.* 70 g des obigen Produktes wurden in 250 ml abs. Alkohol mit 13,7 g Hydrazinhydrat versetzt und 4 Std. bei 25° stehengelassen. Anschliessend wurde mit 25 ml konz. Salzsäure angesäuert und noch 1/2 Std. bei 25° stehengelassen. Das ausgeschiedene Phtalsäurehydrazid wurde abfiltriert und das Filtrat nach Einengen auf ca. 70 ml mit 250 ml Wasser versetzt. Dabei fiel weiteres Phtalsäurehydrazid aus, das abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde nach weiterem Einengen und Filtrieren zur Trockene eingedampft. Durch Umlösen des festen Rückstandes aus Alkohol-Äther erhielt man 21 g 1-Amino-5-nitro-pentan-hydrochlorid, Smp. 113–115°.

$C_5H_{13}O_2N_2Cl$	Ber. C 35,61	H 77,7	N 16,61	Cl 21,03%
	Gef. „ 35,30	„ 8,09	„ 16,59	„ 21,16%

*1-Amino-5-hydroxylamino-pentan.* Zu einer Lösung von 8,2 g 1-Amino-5-nitro-pentan-hydrochlorid in 65 ml Wasser wurden 6,35 g Zink in kleinen Portionen bei 36° im Verlaufe von 15 Min. eingetragen, dann wurde während einer Std. bei gleicher Temperatur gerührt. Hierauf wurde vom unlöslichen Niederschlag abfiltriert, mit 25 ml 2 N Salzsäure angesäuert und im Vakuum eingedampft. Durch mehrmaliges Umkristallisieren des Rückstandes (9,2 g) aus Methanol-Äther erhielt man nach Abtrennung von kleinen Mengen 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan-dihydrochlorid in farblosen Nadeln vom Smp. 135–137°. Zur Analyse wurde 14 Std. bei 25° über  $P_2O_5$  im Hochvakuum getrocknet.

$C_5H_{16}ON_2Cl_2$	Ber. C 31,44	H 8,44	N 14,62	Cl 37,10%
(191,11)	Gef. „ 31,73	„ 8,46	„ 14,41	„ 37,20%

$pK_{MCS}^*$  5,19 und 9,78; Äq.-Gew. 97.

Farbreaktionen, Rf-Werte in verschiedenen Lösungsmitteln und IR.-Absorptionsspektrum stimmten mit denen des Hydrolyseproduktes von Ferrioxamin B überein. Der Misch-Smp. lag bei 135–137°.

#### SUMMARY

A compound  $C_5H_{14}ON_2$  has been isolated as its dihydrochloride from both ferrioxamine B and ferrimycin A, by acid hydrolysis. It was identified as 1-amino-5-hydroxylamino-pentane (II), and this structure confirmed by synthesis.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT,  
Pharmazeutische Abteilung, Basel  
und  
Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 120. Stréopogénines de la caséine

### I. Etude de leur libération et de leur purification

par **Pierre Baudet** et **Emile Cherbuliez**

(18 XII 59)

Les stréopogénines sont des polypeptides qui favorisent le développement des lactobacilles, du *Lactobacillus casei*<sup>1)</sup> en particulier.

On trouve ces polypeptides dans certains hydrolysats de protéines ou dans des autolysats tissulaires<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> D. W. WOOLLEY, J. exp. Med. 73, 487 (1941).

<sup>2)</sup> D. W. WOOLLEY, J. Bact. 39, 287 (1940); P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, travail non publié.

On doit à WOOLLEY<sup>1)</sup> la découverte de ces facteurs de croissance. Il est très probable que parmi des facteurs décrits sous d'autres noms, certains appartiennent également au groupe des strépogénines<sup>3)4)</sup>.

Leur nature peptidique a été bien mise en évidence par WOOLLEY<sup>5)</sup> lorsqu'il isola trois polypeptides strépogéniques d'un hydrolysate chlorhydrique de l'insuline. Dans une suite de travaux<sup>6)</sup>, il synthétisa certaines strépogénines naturelles ainsi que divers polypeptides non encore rencontrés dans la nature, mais qui possèdent également une grande activité strépogénique.

L'activité des strépogénines s'exerce surtout sur la vitesse de croissance, quoique certains organismes comme des Streptocoques hémolytiques du groupe A de LANCEFIELD<sup>7)</sup> aient un besoin absolu de ces facteurs.

Le mode d'activité biologique de ces polypeptides n'est pas encore connu.

L'étude chimique de la ou des strépogénines d'hydrolysats de caséine n'a fait en somme l'objet que d'un seul travail. ÅGREN<sup>4)</sup> effectua par électrodialyse un fractionnement d'un hydrolysate enzymatique de caséine.

Nous avons étudié l'activité strépogénique de divers hydrolysats de caséine par le test de croissance de *Lactobacillus casei* dans l'intention de déterminer le nombre de fractions responsables de cette activité et d'isoler des polypeptides strépogéniques purs.

La caséine que nous avons utilisée est isolée par précipitation isoélectrique, purifiée selon CHERBULIEZ & BAUDET<sup>8)</sup>, puis dévitaminée par extraction prolongée par du méthanol chaud. Après cette dernière opération, la caséine résiduelle contient encore toute l' $\alpha$ -caséine primitive, elle est privée d'une faible quantité de la  $\beta$ -caséine et de la plus grande partie de la  $\gamma$ -caséine, extraites par l'alcool chaud<sup>8)</sup>. Cette opération n'appauvrit pas l'activité des hydrolysats puisque la  $\gamma$ -caséine ne fournit que peu de strépogénines.

Il devint bientôt évident que toute une série de polypeptides étaient responsables de l'activité strépogénique des hydrolysats de caséine débarrassés des macropeptides (inactifs) par l'acide trichloracétique à 45%. En effet, après chromatographie sur papier de ces hydrolysats obtenus à partir des caséines entière,  $\alpha$  ou  $\beta$ , par de la trypsine cristallisée, on constate que l'activité est présente dans plusieurs fractions polypeptidiques, migrant lentement (Rf 0,02–0,20) et dans plusieurs autres à Rf moyens (0,31–0,38) (Fig. 1, a–c). Il est donc indiqué de parler dorénavant non pas de la strépogénine, mais des strépogénines, d'hydrolysats de caséine. Une observation semblable a été faite par WOOLLEY<sup>9)</sup> lors de l'étude d'un hydrolysate chlorhydrique d'insuline.

<sup>3)</sup> N. GROSSOWIECZ, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 49, 8 (1942); M. A. POLLACK & M. J. LINDNER, J. biol. Chemistry 147, 183 (1943); L. D. WRIGHT, H. R. SKEGGS, K. A. VALENTICK & J. S. FRUTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 687 (1950); S. P. MISTY & G. KODICEK, Biochem. J. 49, 18 (1951); E. KODICEK & S. P. MISTY, *ibid.* 51, 108 (1952); M. GYLLENBERG, M. ROSSANDER & P. ROINE, Acta chem. scand. 7, 4 (1953).

<sup>4)</sup> J. ÅGREN, Acta physiol. scand. 17, 1 (1949).

<sup>5)</sup> R. B. MERRYFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 78, 358 (1956).

<sup>6)</sup> R. B. MERRYFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 80, 6635 (1958).

<sup>7)</sup> D. W. WOOLLEY & B. L. HUTCHINGS, J. Bacteriology 39, 289 (1940).

<sup>8)</sup> E. CHERBULIEZ & P. BAUDET, Helv. 33, 398 (1950).

<sup>9)</sup> D. W. WOOLLEY & R. B. MERRYFIELD, J. Amer. chem. Soc. 76, 316 (1954).

En examinant l'activité strépogénique d'hydrolysats trypsiques d'un côté de la caséine entière, de l'autre de ses constituants  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (voir tabl. 1), on constate que la différence d'activité entre l'hydrolysats d' $\alpha$ -caséine et celui de la caséine entière est si faible qu'il n'y a pas d'avantage pratique à fractionner la caséine avant l'hydrolyse. L'hydrolysats de caséine entière a donc été choisi pour l'isolement de quelques-unes des strépogénines.

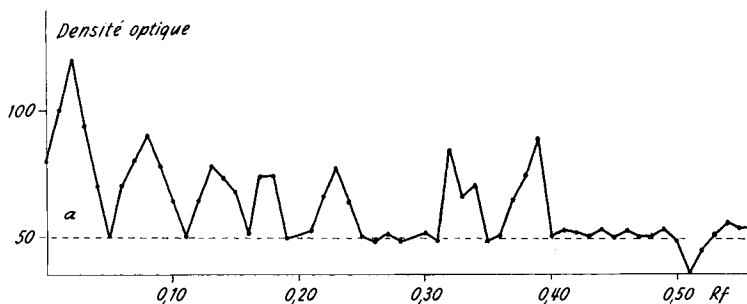


Fig. 1 a

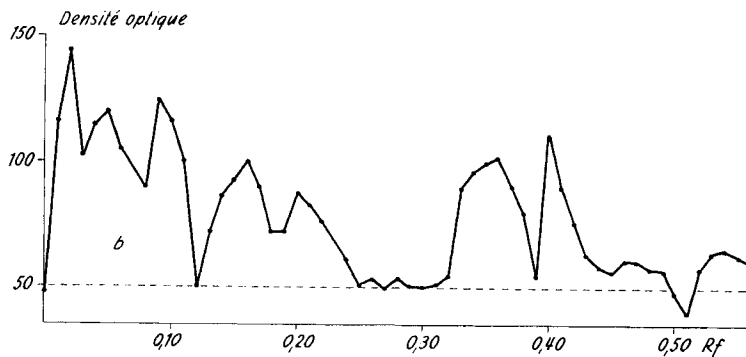


Fig. 1 b



Fig. 1 c

*Révélation bactériologique de chromatogrammes*

-----	Croissance des témoins	a: hydrolysats trypsique de caséine entière
—————	Effet des fractions sur la croissance	b: hydrolysats trypsique d' $\alpha$ -caséine
		c: hydrolysats trypsique de $\beta$ -caséine

Les strépogénines étant des polypeptides, la dégradation effectuée doit en principe être ménagée de manière à fournir un maximum d'activité strépogénique. Dans la dégradation au moyen de la trypsine ou de la chymotrypsine pures, l'hydrolyse

enzymatique s'arrête d'elle-même pratiquement à ce stade, mais dans la dégradation chimique, il y a un optimum d'hydrolyse à réaliser.

Nous avons commencé par comparer au point de vue du rendement en stréptogénines l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse chlorhydrique. A cet effet, nous avons déterminé l'activité des hydrolysats après des durées variables d'hydrolyse, les hydrolysats étant débarrassés des macropeptides par précipitation trichloracétique (à la concentration finale de 45%). L'excès de cet acide est ensuite enlevé par des extractions répétées à l'éther, jusqu'à ce que le pH de l'hydrolysats ainsi purifié soit monté à 3,7.

Tableau 1. *Activité d'hydrolysats tryptiques de la caséine et de ses constituants*

Caséine	entière	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Unités par mg . .	22	24	12	4

Dans la suite, nous désignerons par «hydrolysats» tout court, les hydrolysats exempts de macropeptides et de l'excès d'acide trichloracétique, obtenus par le procédé décrit.

Une fois le pH 3,7 obtenu, il n'y a pratiquement plus d'acide trichloracétique dans la solution que sous forme de trichloracétates des fonctions aminées des polypeptides. La quantité d'acide ainsi liée atteint 37% du résidu sec dans les hydrolysats enzymatiques tryptique aussi bien que chymotryptique. Cela indique un nombre à peu près égal de restes  $\alpha$ -aminés dans ces deux hydrolysats. Les ions trichloracétiques ne gênent pas le dosage bactériologique de l'activité exprimée en unités WOOLLEY<sup>10</sup>), effectué sur des prises amenées au pH 6,8. Nous avons donc renoncé à ce stade à l'élimination complète de l'acide trichloracétique, qui se traduirait seulement par une augmentation de l'activité du résidu sec.

**Hydrolyses.** – Comme agents de l'hydrolyse enzymatique, nous avons choisi la trypsine et la chymotrypsine. Au cours de ces dégradations, on observe toujours 20 à 30 minutes après leur début un blanchissement des solutions de caséine à pH 7,8. Ce phénomène se termine par la floculation d'un matériel relativement abondant, insoluble en milieu acide et neutre et difficilement soluble en milieu alcalin. Cette floculation ne se produit pas si, par exemple, la trypsine utilisée contient d'autres enzymes protéolytiques du pancréas. Il est possible que le floculat (qui est inactif) représente des polypeptides de poids moléculaire élevé dus à une resynthèse enzymatique, puisque nous travaillons avec des solutions relativement concentrées de caséine (env. 5%).

L'hydrolyse tryptique est effectuée par un enzyme deux fois cristallisé. Le rapport enzyme-substrat adopté pour la procédure standard est de 1/173. Dans nos conditions standard, le pH doit être maintenu à 7,8 par adjonction de NaOH durant les 20 premières minutes de l'incubation; ensuite il ne varie plus. Le progrès de cette hydrolyse a été suivi par des dosages spectroscopiques de la somme de la tyrosine liée et libre, non précipitées par l'acide trichloracétique à 10% (lecture de la densité optique à 280 m $\mu$  au pH 12) (voir fig. 2). La dégradation par les trypsines commer-

<sup>10</sup>) H. SPRINCE & D. W. WOOLLEY, J. exp. Med. 80, 213 (1944).

ciales ARMOUR ou WORTHINGTON deux fois cristallisées (la seconde, additionnée de 50% de sulfate de magnésium) présente la même allure (voir fig. 2). La dégradation par une trypsine moins pure, contenant d'autres enzymes protéolytiques (trypsine Novo), est beaucoup plus prononcée (voir fig. 3).

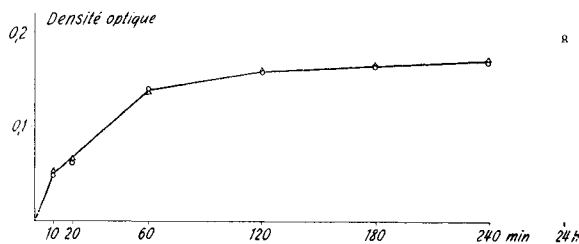


Fig. 2. Progrès de la protéolyse de la caséine par deux trypsines cristallisées

○ ARMOUR    △ WORTHINGTON

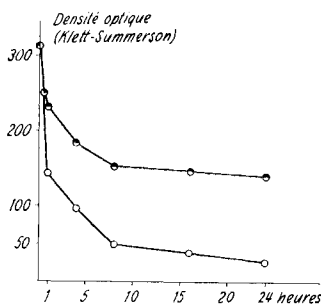


Fig. 3. Progrès de la protéolyse de la caséine par une trypsine cristallisée ARMOUR (●) et par une trypsine impure Novo (○)

Pour établir les valeurs numériques portées dans cette figure, nous avons dosé par colorimétrie (réaction du biuret<sup>11)</sup> la partie restée insoluble dans l'acide trichloracétique à 10%. Après 24 h de dégradation par la trypsine Novo, 97% des caséines sont devenus solubles dans l'acide trichloracétique à 10%, alors qu'avec la trypsine cristallisée, ce pourcentage n'atteint que 73%. La mesure de la dégradation par le dosage spectrophotométrique de la tyrosine dans la solution à 10% d'acide trichloracétique donne un résultat semblable.

L'hydrolyse chymotrypsique est réalisée dans des conditions analogues: enzyme deux fois cristallisée, solution de caséine à env. 5%, rapport enzyme-substrat de 1/173. L'hydrolysate est purifié comme le précédent.

L'hydrolyse minérale partielle a été effectuée en milieu chlorhydrique 12N à 37°, et suivie d'une élimination de l'acide par distillation azeotropique. Cette hydrolyse détruit le tryptophane *in situ* ainsi que la majeure partie des fonctions CONH<sub>2</sub> (63% après 24 h et 83% après 72 h). Les hydrolysats ont été examinés après 3, 12, 24, 36 et 72 h d'incubation. L'activité maximum s'est trouvée après 12 h et 24 h (résultats presque identiques); pour des raisons pratiques, nous avons adopté une durée d'hydrolyse de 24 h. Cet hydrolysate ne contient presque plus de produits précipitables par l'acide trichloracétique à 45% (macropeptides), et son activité stréptogénique est 3 à

<sup>11)</sup> P. BAUDET & CL. GIDDEY, *Helv.* 31, 1879 (1948).

4 fois plus faible (5 à 6 unités par mg) que celle des deux hydrolysats enzymatiques (voir tableau 2). Malgré cette faible activité, cet hydrolysat pouvait être intéressant pour l'isolement d'une stréptogénine, si cette dernière était représentée par un seul ou par un très petit nombre de ses constituants; voilà pourquoi il n'a pas été écarté d'emblée.

Tableau 2. *Activité fournie par divers modes d'hydrolyse de la caséine*

Hydrolysats	Trypsique		Chymo- trypsique	Chlor- hydrique
	Arm.	Novo		
Unités par mg . .	22	11	20	6

*Nomenclature.* Nous désignons par les lettres T, C et H les hydrolysats obtenus respectivement par l'action de la trypsine, de la chymotrypsine et de l'acide chlorhydrique. Les fractions acide, neutre et basique fournies par une première séparation seront désignées par l'adjonction de la lettre A (acide), B (basique) et N (neutre), par exemple TA désigne la fraction acide de l'hydrolysats trypsique. L'opération de séparation suivante conduira à des produits désignés par l'addition d'une lettre grecque, soit TA- $\alpha$ , etc. Les produits des fractionnements ultérieurs seront désignés successivement par: TA- $\alpha$  1; puis TA- $\alpha$  1/1.

**Fractionnement préliminaire des hydrolysats trypsique, chymotrypsique et chlorhydrique.** – Nous commençons par fractionner les trois hydrolysats à l'aide d'une électrodialyse, en polypeptides acides, neutres et basiques, procédé avantageux pour la 2e étape de la purification – électrophorèse à haut potentiel au pH 6,5 pour les polypeptides basiques et acides et au pH 2 pour les polypeptides neutres – puisqu'alors les ampholytes de chaque catégorie ont des charges de même signe.

Tableau 3. *Caractéristiques des fractions lyophilisées d'électrodialyse des hydrolysats*

Hydrolysats	Fractions d'électrodialyse	en % de l'hydrolysats	Activité: unités/mg	Phosphore %	Arginine %	Lysine %
Trypsique	acide	12,6	3	1,15	0	2,5
	basique	38,7	25	0,60	15,6	23,4
	neutre	11,0	13	0,62	5,2	19,7
Chymotrypsique	acide	12,8	10	0,65		
	basique	26,0	18	0,07		
	neutre	32,0	13	0,37		
Chlorhydrique	acide	12,0	2			
	basique	32,5	5			
	neutre	47,6	13			

Les polypeptides acides des hydrolysats trypsique, chymotrypsique et chlorhydrique (respectivement TA, CA et HA), sont très peu actifs ou inactifs (voir tableau 3). De nombreuses sous-fractions<sup>12)</sup> (fig. 4) peuvent en être retirées par élec-

<sup>12)</sup> Les fractions les plus mobiles TA- $\theta$  et CA- $\lambda$  contiennent du phosphore.

trophorèse à 27 volts/cm, au pH 6,5. Mais aucune ne présente une activité strépopogénique intéressante.

Les phérogrammes et les chromatogrammes ont été révélés à la ninhydrine sauf indication contraire dans les légendes des figures. Dans ces dernières, l'intensité des taches ou des bandes est indiquée schématiquement.

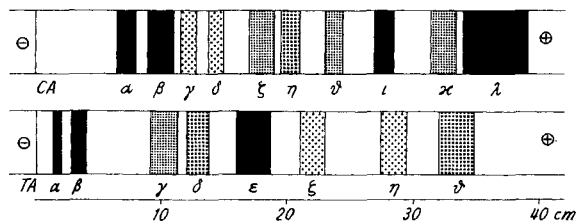


Fig. 4. *Electrophorèses au pH 6,5, 27 volts/cm, 150 min, de TA et CA*

Les polypeptides basiques de l'hydrolysate trypsique (TB) ont par contre une activité assez considérable (voir tableau 3). TB représente un peu plus du tiers de l'hydrolysate, ou sa moitié si on déduit les 35% d'acide trichloracétique qu'il contient encore. En principe, TB doit contenir des polypeptides à lysine ou arginine C-terminales, étant donné la spécificité d'action de la trypsine<sup>13</sup>; effectivement, les différentes strépopogénines que nous avons pu en retirer présentaient bien cette particularité de structure (voir un prochain mémoire). Ce mélange, comme on pouvait s'y attendre, est très complexe; l'électrophorèse à 22 volts/cm au pH 6,5 en sépare 13 sous-fractions (voir fig. 5). L'activité se rencontre dans les bandes TB- $\alpha$ , TB- $\beta$  et TB- $\gamma$  qui migrent le moins loin. Dans le tableau 4, nous donnons des caractéristiques de chacune des sous-fractions.

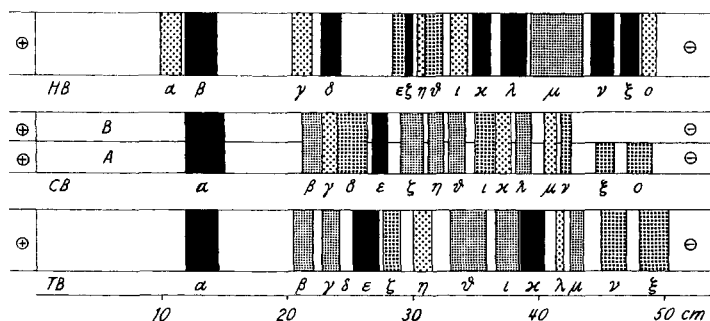


Fig. 5. *Electrophorèses au pH 6,5, 22 volts/cm, 270 min, de TB, CB (A: ninhydrine, B: PAULY) et HB*

Les polypeptides basiques de l'hydrolysate chymotrypsique (CB) ne sont pas beaucoup moins actifs que ceux de TB (voir tableau 3). On en retire 15 sous-fractions par électrophorèse à 22 volts/cm, au pH 6,5 (fig. 5). Parmi les 7 fractions actives, l'activité chez CB- $\gamma$  et CB- $\delta$  est considérable (voir tableau 5).

<sup>13</sup> M. BERGMANN & J. S. FRUTON, *Advances Enzymol.* 7, 63 (1941).

Tableau 4. *Fractions de TB, éluées après une électrophorèse de 22 volts/cm, de 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub>h, au pH 6,5*  
Quantité d'azote total recouvrable théoriquement: 0,978 mg

Fraction	µg d'azote total de la fraction	Activité: unités par mg*	Mobilité électrophorétique par rapport à la lysine = 1
TB-α	187	40	0,31
TB-β	42,4	40	0,50
TB-γ	27,3	55	0,55
TB-δ	10,0	6	0,61
TB-ε	72,0	0	–
TB-ζ	19,8	0	–
TB-η	42,0	0	–
TB-θ	36,4	0	–
TB-ι	137,5	0	–
TB-κ	15,1	0	–
TB-λ	24,8	0	–
TB-μ	14,2	0	–
TB-ν	36,9	0	–

quantité d'azote total retrouvée: 0,655 mg, soit 68%  
\* mg de poids sec calculé sur la base de 16% d'azote (v. p. 920)

Tableau 5. *Fractions de CB, éluées après une électrophorèse de 22 volts/cm, de 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub>h, au pH 6,5*  
Quantité d'azote total recouvrable théoriquement: 0,978 mg

Fraction	µg d'azote total de la fraction	Activité: unités par mg*	Mobilité électrophorétique par rapport à la lysine = 1
CB-α	248	28	0,31
CB-β	22,9	20	0,52
CB-γ	9,5	130	0,58
CB-δ	42,5	98	0,60
CB-ε	62,8	17	0,65
CB-ζ	42,5	0	–
CB-η	42,5	17	0,75
CB-θ	35,5	25	0,80
CB-ι	18,7	0	–
CB-κ	20,8	0	–
CB-λ	14,0	0	–
CB-μ	27,2	0	–
CB-ν	24,4	0	–

quantité d'azote total retrouvée: 0,611 mg, soit 62,4%  
\* mg de poids sec calculé sur la base de 16% d'azote (v. p. 920)

La fraction basique de l'hydrolysate chlorhydrique (HB) a une activité de l'ordre de grandeur de celle de l'hydrolysate lui-même (5 à 6 unités par mg). Son électrophorèse au pH 2 ne fournit aucune fraction strépegénique digne d'intérêt.

TN est aussi un mélange de beaucoup de polypeptides. On s'en rend compte, p. ex., par une chromatographie bidimensionnelle sur papier (voir fig. 6). L'activité est localisée dans les taches 5, 8, 9, 10 et 12. Mais quoiqu'efficace, la chromatographie



bidimensionnelle sur papier se prête mal à un isolement préparatif; c'est pourquoi nous utilisons de nouveau une électrophorèse pour le fractionnement de TN. Des deux pH utilisés dans cette dernière méthode (pH 2 et pH 11), le pH 2 conduit à la meilleure séparation. On obtient ainsi un grand nombre de sous-fractions (voir fig. 7) possédant quelquefois de l'arginine ou de la lysine. TN- $\alpha$ , TN- $\beta$ , TN- $\gamma$  et TN- $\delta$  (voir tableau 6) sont actifs.

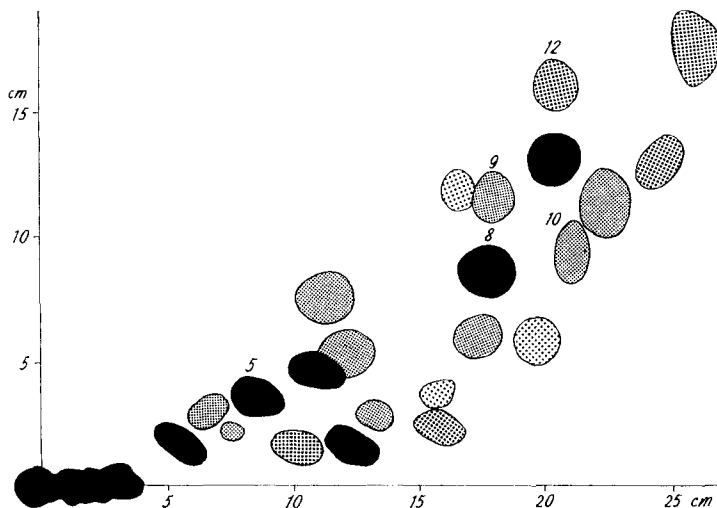


Fig. 6. Chromatographie bidimensionnelle de TN, abscisse: solvant WALEY-WATSON, ordonnée: solvant standard

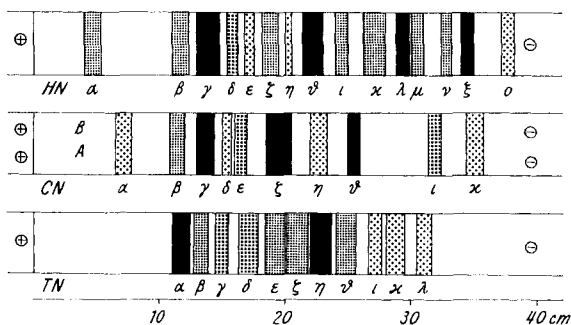


Fig. 7. Électrophorèses au pH 2, 33 volts/cm, 150 min, de TN, CN (A: ninhydrine, B: PAULY) et HN

Les produits neutres fournis par la chymotrypsine (CN) représentent le 32% de l'ensemble. Ils contiennent presque tous de la tyrosine ou de la phénylalanine (révélabes au réactif de PAULY), ce qui est en accord avec la spécificité d'action de cet enzyme. L'activité est répartie dans de nombreuses fractions et n'est élevée nulle part. Il en est de même pour la fraction neutre de l'hydrolysate chlorhydrique (HN).

Cette étude comparative des 3 hydrolysats montre que les sous-fractions de l'hydrolysate chlorhydrique ne présentent guère d'activité stréptogénique intéres-

sante<sup>14)</sup>. Les hydrolysats trypsique et chymotrypsique par contre peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement de strépegénines de la caséine.

Nous avons choisi l'hydrolysats trypsique et notamment ses fractions basique et neutre; sa fraction basique (TB) en particulier est intéressante au point de vue de la quantité comme à celui de l'activité: TB fournit aisément les sous-fractions TB- $\alpha$ , TB- $\beta$ , TB- $\gamma$  (voir fig. 5) très actives. Les sous-fractions CB- $\gamma$  et CB- $\delta$  de l'hydrolysats chymotrypsique sont également très actives mais on ne peut les isoler qu'en faibles quantités.

Tableau 6. *Fractions de TN, éluées après une électrophorèse de 33 volts/cm, de 2 $\frac{1}{2}$ h, au pH 2*  
Quantité d'azote total recouvrable théoriquement: 0,720 mg

Fraction	$\mu\text{g}$ d'azote total de la fraction	Activité: unités par mg*	Mobilité électrophorétique par rapport à la leucine = 1
TN- $\alpha$	117	60	0,47
TN- $\beta$	114	50	0,54
TN- $\gamma$	62,5	22	0,62
TN- $\delta$	39,5	18	0,70
TN- $\epsilon$	51,0	0	–
TN- $\zeta$	42,5	0	–
TN- $\eta$	95,0	0	–
TN- $\theta$	35,0	0	–
TN- $\iota$	5,2	0	–
TN- $\kappa$	4,5	0	–

quantité d'azote total retrouvée: 0,565, soit 78%  
\* mg de poids sec calculé sur la base de 12% d'azote (v. p. 920)

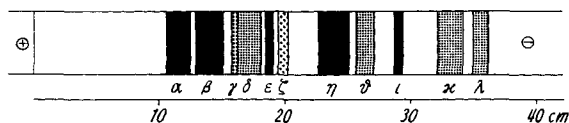


Fig. 8. *Electrophorèse au pH 2, 28 volts/cm, 120 min, de TB- $\alpha$*

**Fractionnement définitif des fractions resp. basique et neutre de l'hydrolysats trypsique (TB et TN)<sup>14a)</sup>.** – *Traitement des sous-fractions de TB.* TB- $\alpha$  a une activité de 40 unités par mg. C'est la fraction électrophorétique la plus abondante de TB (17%). Il s'y trouve plusieurs strépegénines intéressantes, mais c'est un produit très complexe. Soumis à une nouvelle électrophorèse à 30 volts/cm au pH 2, TB- $\alpha$  se subdivise en 11 sous-fractions (voir fig. 8), dont TB- $\alpha$  3, TB- $\alpha$  4, TB- $\alpha$  7, TB- $\alpha$  8 et TB- $\alpha$  9 sont actives (voir tableau 7). La fraction active la plus abondante, TB- $\alpha$  7, n'est plus dédoublable par électrophorèse, tout en étant loin

<sup>14)</sup> Nous jugeons intéressante l'activité d'une fraction inhomogène si cette activité est de l'ordre de 10 unités par mg.

<sup>14a)</sup> Toutes les hydrolyses dont les produits sont étudiés, ont été effectuées avec le même lot de trypsine ARMOUR, dont les résultats étaient parfaitement reproductibles. Or, récemment nous avons dû mettre en œuvre un nouveau lot, exactement du même produit commercial, et nous avons constaté une divergence – reproductible avec ce lot – dans la fraction TB- $\beta$  6/1: au lieu d'un dodécapeptide de structure déterminée, nous isolons à sa place un heptapeptide correspondant aux 7 derniers restes d'acides aminés de l'ancien TB- $\beta$  6/1.

d'être homogène; une chromatographie bidimensionnelle sur papier conduit à 5 nouvelles fractions (voir fig. 9) dont 2 (TB- $\alpha$  7/3 et TB- $\alpha$  7/5) sont actives. Nous n'avons pas encore étudié de plus près ces deux derniers produits dont l'homogénéité n'est pas certaine. Quant aux autres fractions actives de ce groupe (voir tableau 7), elles n'ont pas encore été examinées de plus près.

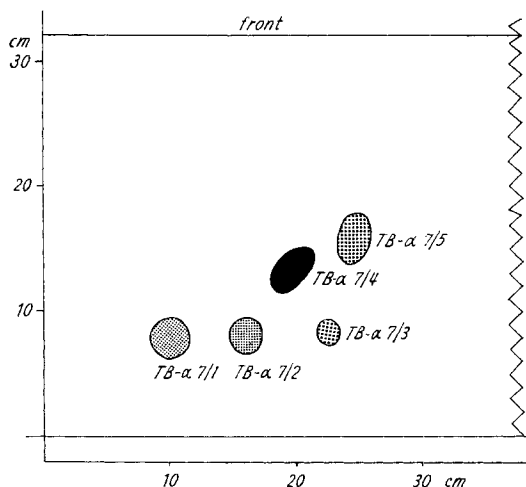


Fig. 9. Chromatographie bidimensionnelle de TB- $\alpha$   
en abscisse: solvant «standard»; en ordonnée: solvant «WALEY-WATSON»

Tableau 7. Fractions de TB- $\alpha$ , éluées après une électrophorèse de 28 volts/cm, de 2h, au pH 2  
Quantité d'azote recouvrable théoriquement: 0,978 mg

Fraction	$\mu\text{g}$ d'azote total de la fraction	Activité: unités par mg*	Mobilité électrophorétique par rapport à la lysine = 1
TB- $\alpha$ 1	86,4	0	—
TB- $\alpha$ 2	73,0	0	—
TB- $\alpha$ 3	35,0	23	0,35
TB- $\alpha$ 4	42,6	52	0,37
TB- $\alpha$ 5	103,5	0	—
TB- $\alpha$ 6	45,5	0	—
TB- $\alpha$ 7	685,0	20	0,53
TB- $\alpha$ 8	59,4	37	0,58
TB- $\alpha$ 9	115,5	23	0,65

quantité d'azote total retrouvée: 0,629 mg soit 64%  
\* mg de poids sec calculé sur la base de 16% d'azote

Quoique l'on obtienne TB- $\alpha$  facilement et avec un bon rendement, nous avons préféré, en raison de sa complexité, pour l'isolement de quelques strérogénines pures, les fractions TB- $\beta$  et TB- $\gamma$  qui constituent des mélanges beaucoup moins complexes.

TB- $\beta$  est fractionné par électrophorèse à haut potentiel au pH 2. Toute l'activité est présente dans la bande TB- $\beta$  6 (voir fig. 10). Eluée, celle-ci représente le 55% de TB- $\beta$ ; dans la réalité, cette proportion doit être un peu plus élevée parce que nous

avons observé une certaine rétention de cette fraction sur le papier d'électrophorèse<sup>15)</sup>. L'activité de TB-β 6 est déjà considérable (voir tableau 8).

La même méthode permet d'obtenir, à partir de TB-γ, TB-γ 2 à côté de six autres sous-fractions inactives (voir fig. 10). Là encore, la fraction strépegénique représente plus de la moitié du total.

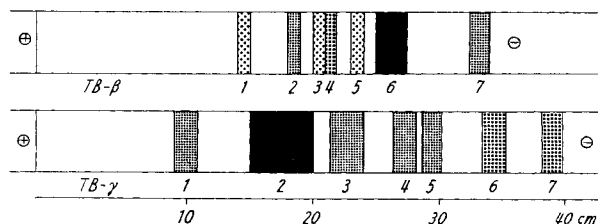


Fig. 10. *Electrophorèses au pH 2, 33 volts/cm, 90 min, de TB-β et TB-γ*

Tableau 8. *Fractions de TB-β et TB-γ, éluées après une électrophorèse de 33 volts/cm, de 90 min, au pH 2*

Fraction	Activité: unités par mg*	Rendement par rapport à TB (%)	Mobilité électrophorétique par rapport à la lysine = 1
TB-β 6	70	2,2	0,67
TB-γ 2	60	0,9	0,51

\* mg de poids sec calculé sur la base de 16,8% d'azote

Le rendement en chacun de ces 2 produits après élution à partir des phérogrammes ne dépasse toutefois par le 2,2% de TB (voir tableau 8).

Les fractions strépegéniques TB-β 6 et TB-γ 2 se révèlent être non homogènes à la chromatographie bidimensionnelle sur papier. Chacune contient 2 peptides strépegéniques (voir fig. 11) à côté de petites quantités de produits inactifs. L'activité de ces 4 fractions va de 80 à 90 unités par mg. Soumis à deux nouvelles chro-

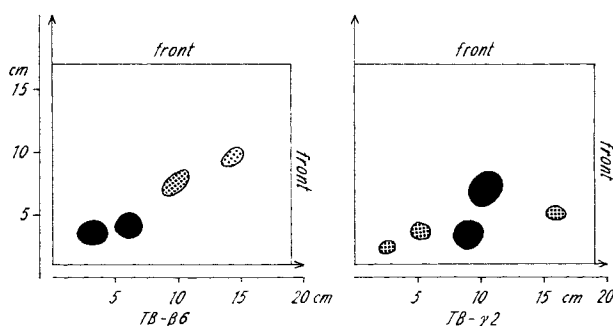


Fig. 11. *Chromatographies bidimensionnelles de TB-β 6 et TB-γ 2*  
 en abscisse: solvant «WALEY-WATSON» (v. p. exp.); en ordonnée: solvant «standard» (v.p.exp.)

<sup>15)</sup> Nous rencontrons ce phénomène chez d'autres fractions, notamment chez TN-α, TN-β et TN-γ.

matographies bidimensionnelles avec d'autres solvants, aucun de ces 4 produits ne s'est dédoublé; nous les avons donc considérés comme homogènes et cette conclusion sera confirmée lors de leur étude ultérieure.

*Traitements des sous-fractions de TN.* Comme nous l'avons vu, TN est une fraction très complexe (voir fig. 6).

Les fractions actives TN- $\alpha$  et TN- $\beta$  obtenues par électrophorèse au pH 2 sont peu stables en chromatographie vis-à-vis du mélange butanol sec., ac. acétique, eau (v. partie exp.); au cours de la chromatographie monodimensionnelle avec ce solvant, TN- $\alpha$  (Rf 0,82) se transforme partiellement en un produit inactif (Rf 0,26). Après une répétition de ce procédé avec TN- $\alpha$  récupéré, tout celui-ci a disparu au profit de la fraction inactive de Rf plus bas. TN- $\alpha$  contient de la cystéine; on pouvait donc penser que cette transformation serait due à un transfert de restes sur des ponts disulfure. Mais la présence, dans le solvant de chromatographie et d'éluion, d'acide thioglycolique ou de N-éthylmaléimide<sup>16)</sup> n'empêche pas l'inactivation. Cette hypothèse paraît donc peu probable. TN- $\beta$  se laisse séparer en deux fractions (TN- $\beta$  1 et TN- $\beta$  2) par électrophorèse au pH 2 poursuivie pendant 2 $\frac{1}{2}$  h; pour TN- $\alpha$ , il faut aller au moins jusqu'à 5 $\frac{1}{4}$  h pour voir s'en détacher une certaine quantité de TN- $\beta$  1 et TN- $\beta$  2 (voir fig. 12).

**Quelques considérations générales.** – Nous remarquons que les strépegénines de l'hydrolysate tryptique de caséine sont surtout des polypeptides basiques. Cela est probablement en relation avec la spécificité de l'action de la trypsine qui scinde les chaînes polypeptidiques avec formation de tronçons à acide diaminé C-terminal, qui se terminent avant le reste suivant d'un autre acide diaminé (sauf dans le cas où l'on aurait les séquences lysyl-proline et arginyl-proline). Si ces peptides sont basiques et qu'ils ne contiennent qu'un seul reste d'acide diaminé, ils doivent être exempts d'acide dicarboxylique. Dans ce cas, leur mobilité électrophorétique doit être proportionnelle à leur poids moléculaire. Or, nous constatons que parmi les peptides basiques, ceux qui sont actifs se trouvent dans les fractions à petite mobilité (TB- $\alpha$ , TB- $\beta$  et TB- $\gamma$ ). Il doit donc s'agir en principe de polypeptides à chaîne relativement longue.

Les strépegénines basiques sont parfaitement stables en solution stérile entre les pH 7,5 et 3, et au cours des fractionnements par électrophorèse aux pH 2 et 6,5 ainsi qu'au cours des chromatographies. Par contre, la fraction strépegénique neutre TN- $\alpha$  est instable. Comme nous l'avons déjà vu, elle se désactive en se transformant en une fraction de plus petit Rf lors de la chromatographie dans un mélange butanol sec., ac. acétique, eau (voir partie exp.). L'activité de nos fractions résiste entre pH 5,5 et 7 à l'autoclavage de 30 min à 110°.

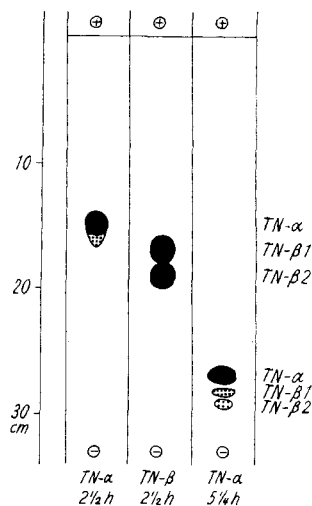


Fig. 12. *Electrophorèses au pH 2, 22 volts/cm, de TN- $\alpha$  et TN- $\beta$*

<sup>16)</sup> A. P. RYLE & F. SANGER, *Biochem. J.* 60, 335 (1955).

La croissance du *Lactobacillus casei* ATCC 7469 est déjà fortement accélérée par la présence de doses minimales de l'hydrolysate tryptique de caséine, une concentration de 6 µg de l'hydrolysate lyophilisé par ml suffit pour assurer la demi-croissance de l'organisme en un temps compris entre 19 et 24 h. Nous avons constaté cependant<sup>17)</sup>, que *Lactobacillus casei* est capable de synthétiser lui-même au cours de son développement actif des peptides à caractère stréptogénique. Dès lors, on peut penser que les stréptogénines exogènes auront surtout pour fonction de réduire le temps nécessaire pour que les stréptogénines endogènes parviennent à une concentration suffisante à la croissance normale du micro-organisme.

Il est intéressant de noter que l'examen biologique de chromatogrammes (voir fig. 1, a et b) révèle non seulement la présence de toute une série de composants actifs mais encore celle d'au moins une fraction nettement inhibitrice (à Rf 0,51).

L'électrophorèse préparative (en bandes pouvant contenir jusqu'à 50 mg de substance) aux pH 6,5 et 2, telle que nous l'utilisons successivement après électrodialyse de l'hydrolysate, conduit à un fractionnement très efficace des stréptogénines basiques; il aboutit à des fractions conduisant à des produits purs après 2 chromatographies sur papier. L'électrophorèse au pH 2 des peptides neutres, par contre, est décevante. On obtient toute une série de bandes nettement délimitées (voir fig. 6), mais l'examen chromatographique de ces fractions montre qu'il se produit des phénomènes d'entraînement réciproque: certaines fractions ayant migré d'un bloc renferment des composants qui, une fois séparés, présentent des vitesses de migration électrophorétique très différentes. Ce phénomène n'est pas supprimé par la présence d'urée dans le tampon utilisé, malgré l'effet dispersant de ce corps sur les associations par liaison hydrogène.

### Partie expérimentale

a) **Dosage microbiologique des stréptogénines.** – Ce dosage est effectué avec *Lactobacillus casei* ATCC 7469, selon la méthode de WOOLLEY<sup>10)</sup>. Les conditions de culture d'entretien et de culture de préparation de l'inoculum jouent un rôle assez important sur la sensibilité du test. Nous décrivons ces conditions dans un journal de bactériologie.

L'unité que nous avons adoptée est celle de WOOLLEY<sup>10)</sup>. C'est la quantité de stréptogénine capable d'assurer la demi-croissance de l'organisme dans les conditions prescrites. La fraction de foie L de WILSON possède une activité correspondant à une unité par mg.

b) **Dévitamination de la caséine.** – La caséine purifiée selon CHERBULIEZ & BAUDET<sup>8)</sup> est dévitaminée par une extraction au Soxhlet de 48 h par du méthanol exempt d'aldéhyde (100 ml de méthanol pour 20 g de caséine). A la fin de l'extraction, la caséine est débarrassée de la quasi totalité de la  $\gamma$ -caséine qui peut être récupérée de l'extrait alcoolique.

c) **Hydrolyses enzymatiques.** – Pour dissoudre la caséine dévitaminée, on en prépare d'abord une pâte en la triturant dans un mortier avec de l'eau à laquelle on ajoute de la soude caustique diluée, en prenant garde à ce que le pH de cette pâte ne dépasse jamais 8. Lorsque la pâte a pris une consistance fileuse, elle est portée dans son volume d'eau, et la dissolution est terminée sous agitation, jusqu'au pH 7,8. La concentration de la caséine est mesurée par l'absorption que présente son contenu en tyrosine et en tryptophane. A cet effet, on ajoute à 0,1 ml de la solution de caséine 5,5 ml de NaOH 0,1N. La densité optique de cette solution est mesurée<sup>18)</sup> à 280 m $\mu$ , sous 1 cm d'épaisseur. Une concentration de 5,35% de caséine correspond à une extinction de 0,630. Elle équivaut à la teneur en tyrosine et tryptophane que donne le dosage spectrophotométrique de GOODWIN & MORTON<sup>19)</sup>. La solution de caséine à 5% au pH 7,8, est

<sup>17)</sup> P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Actes Soc. helv. Sci. nat. 1959, 229.

<sup>18)</sup> Avec un spectrophotomètre BECKMAN DU.

<sup>19)</sup> Biochem. J. 40, 628 (1946).

tempérée 60 min à 38°, puis on y ajoute l'enzyme dans le rapport enzyme-substrat de  $1/_{173}$ . La trypsine ARMOUR, lot 33403, à 2820 unités au mg est un produit deux fois cristallisé; la chymotrypsine WORTHINGTON, lot CD 576-81, est également deux fois cristallisée. Les incubats sont recouverts dès le début de l'hydrolyse d'une mince couche de toluène de façon à éviter toutes altérations bactériennes. Le tout est incubé 24 h à 38°  $\pm$  0,1°. Il faut maintenir le pH à 7,8 par addition progressive de soude caustique 1N durant les 20 premières minutes de l'incubation, ensuite, la vitesse d'hydrolyse ayant baissé beaucoup et les polypeptides formés exerçant une action tampon, le pH se maintient à 7,8. Dans les solutions de caséine entière et surtout d' $\alpha$ -caséine, un trouble se développe dans les solutions dès la 20e min de l'incubation, il se résoud en un précipité après plusieurs h. L'examen de ce précipité montre que pour la caséine entière, il contient 10 à 15% de l'azote protéique total. Le précipité est insoluble en milieu neutre ou acide jusqu'à un pH inférieur à 1, il est très difficilement soluble en milieu alcalin. — Après l'incubation, les enzymes sont désactivés par une ébullition de 7 min, et les précipités, éloignés à température ordinaire par une centrifugation à 2500 tours/min durant 15 min. Aux solutions claires, est ajouté alors un volume d'acide trichloracétique à 20% qui précipite une fraction polypeptidique; celle-ci est éliminée après 20 min de repos à température ordinaire par une centrifugation à 3200 tours/min durant 20 min à température ambiante. On ajoute ensuite au centrifugat de l'acide trichloracétique cristallisé puriss. à raison de 35 g pour 100 ml, ce qui provoque une nouvelle précipitation; après 20 min de repos à la température du laboratoire, le précipité est éliminé comme le précédent. Une prise du dernier supernageant ne doit plus se troubler par l'adjonction d'acide trichloracétique cristallisé.

L'excès d'acide trichloracétique est éliminé par 5 extractions successives au moyen de 2 volumes d'éther. Le pH final de la solution aqueuse doit être compris entre 3,7 et 3,8. La solution aqueuse est alors concentrée dans un évaporateur rotatif<sup>20)</sup> à 42° jusqu'à ce que le volume atteigne environ 100 ml pour 10 g de caséine mise en œuvre. Cette liqueur est congelée sur les parois d'un ballon rond de 1 litre et lyophilisée sous 0,01 Torr durant 10 h. Il en résulte une poudre de faible densité, blanche et modérément hygroscopique. Elle peut être conservée à température ordinaire en flacons bouchés à l'émeri pendant des années sans perdre aucune de ses propriétés. L'hydrolysate ainsi préparé contient 37% d'acide trichloracétique sous forme salifiée. Il représente le 70% de la caséine mise en œuvre.

d) **Dosage de l'ion trichloracétique.** — Le dosage de l'ion trichloracétique est fait par sa rétention sur une résine modérément basique, l'amberlite IR 4 B.

Après passage d'une quantité connue d'hydrolysate lyophilisé contenant de l'acide trichloracétique, on dose la quantité de cet acide que cette prise de résine peut encore fixer, en y faisant passer une quantité connue de l'acide dont on dose la partie non retenue. La quantité d'acide fixée dans la dernière opération, déduite de la capacité de la résine mise en œuvre, donne le chiffre d'acide trichloracétique dans la prise de l'hydrolysate lyophilisé. Voici un exemple de ce dosage:

On soumet l'amberlite IR 4 B (OH-) à trois cycles de lavages successifs par ClH 1N et NaOH 1N; 200 mg de cette résine fixent 69,45 mg d'acide trichloracétique. Pour le dosage, on fait passer sur une colonne de 200 mg de cette résine, une solution de 10 ml contenant 100 mg de l'hydrolysate lyophilisé et on lave à l'eau jusqu'à ce qu'une goutte de l'effluent ne donne plus de réaction à la ninhydrine. On fait couler à travers la résine préalablement égouttée sous un vide léger, 5 ml d'acide trichloracétique 0,114N (contenant 93,10 mg d'acide), puis on repasse l'effluent sur la résine, ce qui homogénéise la phase aqueuse en contact avec cette dernière. Trois prises de 1 ml du dernier effluent, titrées au rouge de méthyle, ont consommé chacune 7,5 ml NaOH 0,01N; cela indique que 32,1 mg d'acide trichloracétique ont été retenus par la résine. Comme 200 mg de celle-ci en fixent 69,45 mg, le poids d'acide trichloracétique provenant des 100 mg de l'hydrolysate lyophilisé est donc de 69,45 mg moins 32,1 mg, soit 37,3 mg.

e) **Marche des hydrolyses tryptiques.** — 1) *Hydrolyse par les trypsines cristallisées.* 10g de caséine dévitaminée (qualité poudreuse) sont mis en pâte comme il a été décrit, puis finalement dissous à 200 ml d'eau; le pH est ajusté à 7,8.

On prélève 2 fois 0,1 ml de cette solution pour le dosage spectrophotométrique de la concentration en caséine. On obtient une densité optique de 0,560 et de 0,565 ce qui indique une concentration en protéines de 4,6%.

<sup>20)</sup> L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

La solution de caséine est portée à 25° puis divisée en deux moitiés. Dans la première on introduit 12,5 mg de trypsine ARMOUR deux fois cristallisée, lot 33403, à 2820 u. ARMOUR/mg (E/S = 1/184), et dans l'autre lot 25 mg de trypsine cristallisée WORTHINGTON lot ER 571, contenant 50% de sulfate de magnésium (E/S = 1/184).

L'incubation est effectuée à 38° ± 0,1°. Durant les 20 premières min, le pH est ajusté à 7,8 environ toutes les 5 min, il s'y maintient par la suite.

Pour la mesure de la protéolyse, on prélève 1 ml des incubats et l'introduit dans un tube à centrifuger conique de 10 ml contenant 1 ml d'acide trichloracétique à 20%. On agite doucement la suspension ainsi formée, la laisse sédimenter 60 min à 25° ± 0,1°. Après une centrifugation de 10 min à 2000 tours/min, on prélève 1 ml du supernageant que l'on dilue à 25 ml. On détermine la densité optique de cette solution à 280 m $\mu$ , sous 1 cm d'épaisseur.

Tableau 9. Densités optiques à 280 m $\mu$  des liqueurs d'hydrolyse (trypsines crist.) après défécation par l'acide trichloracétique à 10%

Temps d'incubation, min . . .	5	10	20	60	120	180	240	300	360	1440
Tryps. ARMOUR .	0,019	0,057	0,062	0,157	0,0159	0,0166	0,167	0,177	0,194	0,198
Fraction non précipitée (%) .	3,5	10,0	12,0	30,0	29,5	31,0	31,2	33,5	36,5	37,0
Tryps. WORTH. .	0,019	0,050	0,065	0,140	0,161	0,167	0,172	0,177	0,195	0,197
Fraction non précipitée (%) .	3,5	9,5	12,5	30,0	30,2	31,2	31,5	33,5	36,7	37

2) Comparaison entre l'hydrolyse de la caséine par la trypsine cristallisée (ARMOUR) et par la trypsine non cristallisée (Novo). On prépare une solution de caséine à 5,35% (DO à 280 m $\mu$  = 0,630). Une prise de 100 ml est incubée à pH 7,8 et à 38° ± 0,1° avec 50 mg de trypsine Novo, 1000 u. ARMOUR par mg (E/S = 1/106), et une autre prise de 600 ml est incubée dans les mêmes conditions avec 179 mg de trypsine cristallisée ARMOUR, lot 33403, 2820 u. ARMOUR/mg (E/S = 1/177). Pour suivre la protéolyse, on procède comme indiqué plus haut sauf que la dilution finale est faite à 10 ml au lieu de 25.

Tableau 10. Densités optiques à 280 m $\mu$  des liqueurs d'hydrolyse (trypsine cristallisée et non cristallisée) après défécation par l'acide trichloracétique à 10%

Temps d'incubation, min . . .	5	10	20	60	120	240	360	480	1440
Tryps. ARMOUR .	0,177	0,232	0,315	0,410	0,458	0,575	0,675	0,790	0,960
Fraction non précipitée (%) . .	13,0	17	24	30	33	42	49	58	70
Tryps. Novo . .	0,137	0,265	0,458	0,770	1,020	1,140	1,215	1,290	1,335
Fraction non précipitée (%) . .	9	19,5	33	56	73	83	88,5	94	97

Ces deux dernières protéolyses ont été également suivies par colorimétrie au biuret<sup>11)</sup> de la fraction insoluble dans l'acide trichloracétique à 10%. A l'inverse de la détermination précédente, on mesure ici la fraction de caséine non encore dégradée ou assez peu dégradée pour être précipitée par l'acide trichloracétique à 10%.

Pour ce dosage, on introduit une prise de 1 ml des incubats dans un tube à centrifuger conique, contenant 1 ml d'acide trichloracétique à 20%. Après une attente de 60 min à 25° ± 0,1°, le précipité est centrifugé 10 min à 3200 tours/min, puis égoutté et lavé deux fois par 3 ml d'acide trichloracétique à 10%. Le culot est alors dissout par de la soude caustique et le dosage au biuret<sup>11)</sup> est effectué.



Tableau 11. Mesures colorimétriques au biuret des culots trichloracétiques à 10% de caséine par une trypsine crist. et une trypsine non crist.

Coefficients d'extinction mesurés au colorimètre KLETT-SUMMERSON

Temps d'incubation, min	0	30	60	240	320	960	1440
Tryps. ARMOUR . . . . .	315	250	235	185	155	145	110
Fraction non préc. (%) . . . . .	0	18	28	43	53	57	68
Tryps. Novo . . . . .	315	250	145	100	50	40	30
Fraction non préc. (%) . . . . .	0	18	56	72	90	93	97

f) **Méthodes analytiques.** – Révélations à la ninhydrine. Les bandes-témoins des phérogrammes et les chromatogrammes sont révélés avec une solution de ninhydrine de 0,4% dans le butanol sec. contenant 1% d'acide acétique.

Révélation au réactif de PAULY: voir <sup>21</sup>).

Dosage de l'azote total des fractions polypeptidiques. Il est réalisé par l'ultramicrodosage de BAUDET & CHERBULIEZ<sup>22</sup>). On tient compte pour les polypeptides basiques d'une teneur moyenne en azote total de 16% et pour les polypeptides neutres d'une teneur de 12%, chiffres moyens que donne le dosage d'azote KJELDAHL de ces fractions.

Dosage de l'arginine et de la lysine des fractions. La fraction en question est hydrolysée en tube capillaire dans l'acide chlorhydrique 5,7N à  $100^{\circ} \pm 2^{\circ}$  durant 18 h. L'arginine et la lysine de ce dernier hydrolysat sont séparés par une électrophorèse de 22 volts/cm au pH 2 de 4 h 50 sur une feuille de papier SCHLEICHER & SCHUELL 2043 a, lavé, de 82 cm de long et de 15 cm de large. Les taches sont d'abord révélées par de la ninhydrine à 0,025% dans de l'acétone, puis le phérogramme est rendu alcalin par pulvérisation d'une solution de KOH 0,1N dans de l'éthanol afin de chasser l'ammoniac éventuellement fixé sur le papier. Les taches sont alors découpées, et la réaction à la ninhydrine est commencée *in situ* et terminée en solution à l'aide du réactif de MOORE & STEIN, modifié<sup>22</sup>). La densité optique des solutions colorées est déterminée au photocolorimètre KLETT-SUMMERSON, avec le filtre 54.

Tableau 12. Dosage de l'arginine et de la lysine dans les électrodialysats TN, TB, TA

	TN 100 µg		TB 100 µg		TA 100 µg	
	µM trouvé	%	µM trouvé	%	µM trouvé	%
Lysine	0,030 0,029	5,2	0,09 0,08	15,6	0 0	
Arginine	0,131 0,135	19,7	0,160 0,160	23,1	0,015	2,5

Dosage du phosphore dans les fractions. On dissout env. 10 mg du produit à examiner dans 2 ml de NaOH 0,75N. Après 15 h de repos, à  $38^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ , on continue selon CHERBULIEZ & BAUDET<sup>9</sup>), en utilisant la méthode colorimétrique de KING<sup>23</sup>).

Révélation bactériologique des chromatogrammes des hydrolysats tryptiques des caséines entière,  $\alpha$  et  $\beta$ . Après les chromatographies, les bandes de papier (20 mm de large) débarrassées du solvant à  $40^{\circ}$ , sont découpées en tranches de 5 mm de hauteur, de la ligne de base jusqu'à la ligne du front du solvant. Chacun de ces fragments de chromatogramme est introduit séparément dans un tube à bactériologie qui recevra 10,5 ml du milieu de dosage bactériologique (milieu de LANDY-

<sup>21</sup>) R. ACHER & C. CROCKER, Biochem. biophys. Acta 9, 704 (1952).

<sup>22</sup>) P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Helv. 41, 1613 (1957).

<sup>23</sup>) E. J. KING, Biochem. J. 26, 292 (1932).

DICKEN). Après autoclavage, le dosage bactériologique est poursuivi de façon habituelle<sup>16)</sup>, et la croissance de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 est déterminée par néphélométrie après 20 h.

Tableau 13. Dosage du phosphore dans les fractions TB, TN et TA

Fractions	Quantité en mg	g de phosphore	% en moy.	Fractions	Quantité en mg	g de phosphore	% en moy.
TB	14,7	89,2	0,60	CB	28,8	21	0,07
	14,42	85,7			28,3	19,5	
TN	15,37	106	0,65	CN	15,7	59,5	0,38
	16,10	110			55	90	
TA	7,50	85,7	1,14	CA	37,7	90	0,65
	7,50	87,5					

Tableau 14. Electrophorèses des fractions

Fraction	Quantité mg	Papier <sup>a)</sup>	pH	volts/cm	milli-ampères/cm	Durée min
TB	7,5	W 3MM	6,5	22	0,48	270
	50	W 3	6,5	33	0,68	180
CB	7,5	W 3MM	6,5	22	0,48	270
	50	W 3	6,5	33	0,68	180
TA	15	W 3	6,5	27	0,43	150
CA	15	W 3	6,5	27	0,43	150
TN	7,5	W 3	2	33	0,43	150
	20	W 3	2	33	0,43	180
CN	20	W 3	2	33	0,43	180
HN	20	W 3	2	33	0,43	180
TB- $\alpha$	7,5	W 3	2	28	0,38	120
TB- $\alpha$ 7	7,5	W 3MM	2	22	0,26	150
TB- $\alpha$ 3	6	W 3MM	2	22	0,26	150
TB- $\alpha$ 4	7,5	W 3MM	2	22	0,26	150
TB- $\beta$	15	W 3 lavé	2	33	0,43	90
TB- $\gamma$	15	W 3 lavé	2	33	0,43	90
TN- $\alpha$	10	W 3	2	22	0,26	180
TN- $\alpha$	10	W 3	2	22	0,26	315
TN- $\beta$	10	W 3	2	22	0,26	180

a) W 3MM: WHATMAN no 3 MM  
W 3: WHATMAN no 3  
W 3 lavé: WHATMAN no 3 lavé par HCOOH 4N et eau

g) **Electrophorèse en bande.** – Les électrophorèses sont faites sur du papier WHATMAN No. 3, WHATMAN No. 3 lavé et WHATMAN No. 3 MM (papier épais).

Un voltage de 33 volts par cm pour un papier de 62 cm de long ou de 22 volts par cm pour un papier de 82 cm de long est appliqué aux bornes des électrodes, de façon à séparer les constituants en un temps le plus court possible. La chaleur due à l'effet JOULE est en grande partie dispersée par conduction dans une grande masse de toluène, qui recouvre les papiers, et par refroidissement du toluène le long de ceux-ci.

Deux types d'appareils sont utilisés, ils feront l'objet d'une description ultérieure. Dans l'un, on travaille avec deux papiers de 15 × 62 cm qui y sont disposés en diagonale, ou bien on utilise un seul papier de 15 × 82 cm lorsqu'une électrophorèse doit être prolongée. Dans l'autre, on peut

placer six papiers de 25 × 62 cm disposés verticalement. Dans les deux cas, le champ électrique est toujours uniforme sur toute la feuille parce que l'irrigation de cette dernière par le tampon se fait régulièrement et continuellement. Nous utilisons toujours des tampons de faible force ionique et dont les constituants sont volatils:

pour pH 11: pipéridine, ac. acétique et eau (en vol. 7/2,5/90,5)  
 pour pH 6,5: pyridine, ac. acétique et eau (en vol. 10/0,4/89,6)  
 pour pH 2: ac. acétique, ac. formique et eau (en vol. 30/23/94,7)

L'obtention d'un dépôt régulier du matériel sur le papier d'électrophorèse demande beaucoup de soin. On y parvient si l'on trempe le papier plié sur la ligne de dépôt (longueur 15 cm) dans une rigole en polyéthylène, coupée à angle droit et contenant 0,3 à 0,8 ml de la solution à déposer. En retirant le papier de cette rigole, on constate que la solution est fixée sur le papier en un rectangle régulier de 15 × 0,5 à 15 × 1,5 cm. Par évaporation au moyen d'air chaud, le solvant est éliminé du papier. Pour rétrécir la largeur de la bande de dépôt (quelquefois colorée en jaune, selon la nature des fractions) à 3 mm ou moins, on étale le papier déplié sur une plaque de verre et on place de part et d'autre de la bande à 3 cm une baguette de verre, le long de laquelle on fait couler avec une pipette, le tampon. Les fronts de diffusion du tampon repoussent de part et d'autre la substance de la bande vers son milieu.

Lorsqu'il s'agit de récupérer les fractions à partir du phérogramme, une bande longitudinale préalablement délimitée sur le papier est découpée et les diverses zones sont localisées avec la solution de ninhydrine à 0,4%. Sur le reste du papier (12 cm), les zones intéressantes sont découpées alors que le papier est encore humide (l'assèchement du phérogramme occasionne des pertes de matériel peptidique) et immédiatement éluées.

En utilisant plusieurs appareils d'électrophorèse à haut voltage, nous pouvons fractionner des quantités relativement importantes de matériel (par ex. 600 mg de la fraction TB par jour).

**h) Chromatographies.** – Les chromatographies sont effectuées dans des cuves de verre, étanches, placées dans une enceinte thermostatée à  $24^\circ \pm 2^\circ$ . On les effectue toutes avec le système descendant. Les révélations sont faites à l'aide de la solution de ninhydrine à 0,4%.

Le tableau 15 contient les données techniques concernant les chromatographies exécutées.

Tableau 15. *Chromatographies de fractions*

Figure	Fraction	Papier <sup>a)</sup>	Quantité déposée mg	Solvant 1re direct.	Solvant 2me direct.	Durée heures	
						1re dir.	2me dir.
1 a	hydr. tryps. $\left\{ \begin{array}{l} \alpha \\ \beta \end{array} \right.$ ent. caséines	W 1	1	standard <sup>b)</sup>		22	
1 b		W 1	1	standard		22	
1 c		W 1	1	standard		22	
9	TB- $\alpha$	S-S 2043 a	0,3	standard	WALEY-WATSON	15	23
11	TB- $\beta$	S-S 2043 a	0,1	standard	WALEY-WATSON	9 <sup>1/2</sup>	9
11	TB- $\gamma$	S-S 2043 a	0,1	standard	WALEY-WATSON	9 <sup>1/2</sup>	9
6	TN	W 3	5	standard	WALEY-WATSON	23 <sup>3/4</sup>	20 <sup>1/3</sup>

a) W: WHATMAN, S-S: SCHLEICHER & SCHUELL.  
 b) Butanol sec., ac. acétique, eau: 67/16/25 vol.  
 c) Butanol-n, pyridine, ac. acétique, eau: 30/20/6/24 vol.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE qui a permis la réalisation du début de ce travail, ainsi que la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE à Bâle, qui s'y est intéressée par la suite.

## RÉSUMÉ

La libération des strépopgénines de la caséine a été réalisée par hydrolyse chlorhydrique, chymotrypsique et trypsique. L'hydrolyse minérale aboutit à un hydrolysats peu actif; par contre les deux hydrolyses enzymatiques libèrent une activité strépopgénique notable qui a pratiquement la même valeur dans les deux cas.

Des fractions actives et des polypeptides purs ont été retirés de l'hydrolysats trypsique de caséine par des procédés alliant l'électrodialyse, l'électrophorèse à haut potentiel à différents pH, et la chromatographie sur papier.

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique  
de l'Université de Genève

## 121. Höhere Austausch und das Additivitätsproblem in der Theorie der chemischen Bindung

von M. Bärlocher

(18. II. 60)

### Einleitung

Bisher wurde in der Theorie der chemischen Bindung nach der Valenzmethode meistens nur der Zweier-Austausch berücksichtigt. Während diese Näherung für grosse Abstände hinreichend ist, müssen bei kleineren Atomabständen auch höhere Austausche berücksichtigt werden.

Zweck der Arbeit ist es, zuerst die allgemeine Theorie des Dreier-Austausches zu entwickeln.

In § 1 werden durch Verallgemeinerung der bekannten Theorie für Zweier-Austausche die Bindungsgleichungen unter Berücksichtigung des Dreier-Austausches abgeleitet. Ferner wird die Wirkung des Operators der Vertauschung von 3 Elektronen auf die reinen Valenzzustände allgemein angegeben.

Als Anwendung erfolgt in § 2 die Berechnung der Bindungsenergie von 3 H-Atomen für gewisse Abstände und Anordnungen der Kerne unter Berücksichtigung des Zweier- und Dreier-Austausches sowie der Überlappungsintegrale.

In § 3 wird die lineare Kette von  $N$  H-Atomen mit Berücksichtigung des Zweier- und Dreier-Austausches und der Überlappungsintegrale behandelt. Hier stellt sich die prinzipielle Frage nach der Additivität der Bindungsenergie bei langen Ketten, d. h. ob  $\epsilon_{N/N}$  einem konstanten Grenzwert zustrebt, unabhängig von  $N$ , wenn  $N$  gross ist. HULTHÉN hat dies unter Berücksichtigung des Zweier-Austausches bereits allgemein gezeigt. Wir zeigen für unseren Fall die Additivität durch Extrapolation von  $N = 2, 4, 6$  und  $8$ . Bei Berücksichtigung des Dreier-Austausches und der Überlappungsintegrale konnte das nur numerisch gezeigt werden, durch Einsetzen der numerischen Werte für die Integrale bei speziellen Abständen, da die allgemeinen Formeln zu kompliziert sind.

Die Frage der Additivität ist sehr wichtig für die organische Chemie (Paraffinketten), wo sie eine experimentelle Tatsache ist. Wir haben daher in § 4 die Frage für die lineare Kette von zweiwertigen Atomen weitergeprüft (wobei wir hier lediglich den Zweier-Austausch berücksichtigten). Diese Kette ist ein Modell für die Paraffinkette; die  $\text{CH}_2$ -Gruppe wird als zweiwertiges Atom betrachtet. Durch Berechnung der Energie für  $N = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  und  $8$  ergibt sich tatsächlich, dass  $\epsilon_{N/N}$  einem Grenzwert zustrebt (der bei  $N = 8$  praktisch erreicht ist). Das Resultat in § 4 kann mit den experimentellen Daten für die Paraffinkette verglichen werden. Bei Einsetzen der halbempirischen Werte für die Integrale, die in einer früheren Arbeit von HEITLER aus den einfachen Kohlenwasserstoffen ( $\text{CH}_4, \text{C}_2\text{H}_2, \text{C}_2\text{H}_6$  usw.) gewonnen wurden, ergibt sich eine vernünftige Übereinstimmung mit der Erfahrung.