

k) *Ultracentrifugation* : à une vitesse de rotation de 60.000 tours/minute, à 23° C, la constante de sédimentation est de  $5,18 \times 10^{-13}$ .

Le « pic » obtenu indique qu'il n'y a qu'une seule substance. La valeur des constantes de sédimentation et de diffusion permet de se faire une idée approximative du poids moléculaire qui se situe aux environs de 50.000. Des mesures plus précises, tenant compte de la viscosité et du volume molaire partiel, sont en cours.

*Conclusions.* — 1) Les trois fractions actives de l'iturine se différencient par leur stabilité aux rayons ultra-violet, par leur spectre d'absorption ultra-violet, par la chromatographie sur papier, par leur capacité de dialyser ou non au travers d'une membrane de cellulose. 2) La fraction L est de nature protéique, et certains de ses acides aminés ont été dosés. Sa mobilité électrophorétique, ses constantes de diffusion et de sédimentation, ses principales propriétés ont été déterminées.

(Centre de Recherches pour la Pénicilline et les autres Antibiotiques. Laboratoires de Microbiologie (M. Welsch), Chimie-Physique (V. Desreux) et Biochimie (M. Florkin), Liège).

### Analyse et purification de l'actinomycétine par adsorption.

Note de JEAN-MARIE GHUYSEN, présentée par MAURICE WELSCH.

Nous avons signalé (1) que les effets bactériolytiques exercés par l'actinomycétine sur *Escherichia coli* chauffée d'une part, sur *Staphylococcus aureus* vivant d'autre part, évoluent indépendamment l'un de l'autre au cours de l'incubation de *Streptomyces albus* G (2) et qu'il n'existe pas de proportionnalité entre ces deux types d'activité.

Par adsorption de l'actinomycétine concentrée (1) sur des substrats divers, nous avons confirmé l'existence d'au moins deux principes distincts, nécessaires à ses différentes manifestations lytiques.

Avec les substrats minéraux usuels (divers acticarbonés, amidon, alumine), il nous a été impossible d'obtenir l'adsorption spécifique soit de l'un ou de l'autre principe lytique, soit des impuretés colorées qui les accompagnent. Toutefois, après adsorption sur silica-gel, dans des conditions appropriées de pH et de force ionique, le rapport : activité colilytique/activité staphylolytique d'une préparation donnée est profondément modifié. De plus, l'activité staphylolytique, à l'inverse de l'activité colilytique, est plus fortement adsorbée à 37° qu'à 0°. Cet adsorbant, malheureusement, n'est pas susceptible d'opérer une séparation satisfaisante des impuretés colorées. Aussi, avons-nous étudié l'adsorption sur les substrats microbiens spécifiques eux-mêmes. Cette méthode nous a permis d'obtenir des solutions actives incolores.

(1) J. M. Ghuyesen, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1952, t. 146, p. 1268.

(2) M. Welsch, *Rev. belge Pathol. Méd. expér.*, 1947, t. 18, suppl. 2.

*Techniques.* — A un volume donné d'actinomycétine dialysée, on ajoute une quantité déterminée de corps microbiens servant à l'adsorption : *S. aureus* vivants, tantôt tués par chauffage de 3 minutes, tantôt vivants, est réalisée dans des conditions bien déterminées, au moyen de divers tampons (acétate, orthophosphates mono- et bi-basiques ; véron, NaOH), couvrant le domaine de pH 6 à 10,4, où l'adsorption colorée est nulle ou négligeable et où l'activité bactériolytique sont stables.

Après séjour en glacière pour obtenir l'équivalent d'une suspension bactérienne est centrifugée à froid, les supernatants sont recueillis et dialysés ; enfin, leurs activités sont mesurées selon les techniques antérieurement décrites.

### ISOTHERMES D'ADSORPTION A 0°C SUR SUBSTRATS MICROBIENS

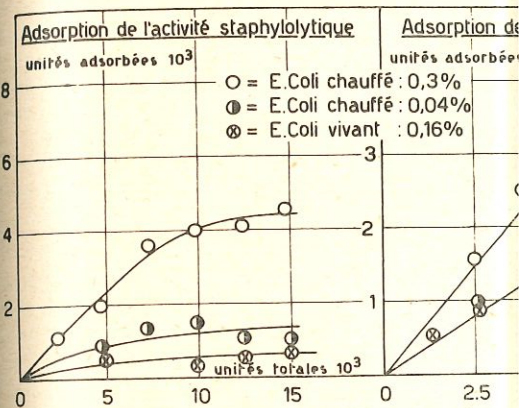


Fig. 1.

*Résultats expérimentaux.* — 1) *E. coli* et *S. aureus* et l'autre, l'activité colilytique comme l'activité staphylolytique (1 et 2).

2) L'adsorption n'est efficacement réalisée qu'à pH 7,3 (tampon orthophosphate), et en présence d'une quantité de corps microbiens (1,5 p. 100), l'adsorption colilytique est indépendante de la force ionique  $\mu = 0,28$ . Au contraire, dans les mêmes conditions, l'adsorption staphylolytique, appréciable à force ionique  $\mu = 0,28$ , est pratiquement nulle lorsque  $\mu = 0,02$ . C'est pour ces raisons que les isothermes d'adsorption, dont la figure 1 donne un exemple, sont plus élevées à  $\mu = 0,02$  et pH 7,3. De même, les résultats expérimentaux successifs, représentés à la figure 2, ont été obtenus à environ.

ne vitesse de rotation de 60.000 tours/...  
le sédimentation est de  $5,18 \times 10^{-13}$ .  
qu'il n'y a qu'une seule substance. La  
mentation et de diffusion permet de se  
du poids moléculaire qui se situe aux  
res plus précises, tenant compte de la  
e partiel, sont en cours.

fractions actives de l'iturine se diffé-  
x rayons ultra-violet, par leur spectre  
la chromatographie sur papier, par  
on au travers d'une membrane de cel-  
de nature protéique, et certains de ses  
Sa mobilité électrophorétique, ses cons-  
entation, ses principales propriétés ont

a Pénicilline et les autres Antibiotiques.  
gie (M. Welsch), Chimie-Physique (V.  
Florkin), Liège).

de l'actinomycétine par adsorption.

SEN, présentée par MAURICE WELSCH.

les effets bactériolytiques exercés par  
chia coli chauffée d'une part, sur Sta-  
l'autre part, évoluent indépendamment  
incubation de Streptomyces albus G (2)  
ortionnalité entre ces deux types d'acti-

mycétine concentrée (1) sur des substrats  
L'existence d'au moins deux principes  
différentes manifestations lytiques.

ux usuels (divers acticarbonés, amidon,  
ossible d'obtenir l'adsorption spécifique  
ncipe lytique, soit des impuretés colorées  
ois, après adsorption sur silica-gel, dans  
de pH et de force ionique, le rapport :  
taphylolytique d'une préparation donnée  
e plus, l'activité staphylolytique, à l'in-  
e, est plus fortement adsorbée à 37° qu'à  
eusement, n'est pas susceptible d'opérer  
des impuretés colorées. Aussi, avons-nous  
substrats microbiens spécifiques eux-  
a permis d'obtenir des solutions actives

a Soc. de Biol., 1952, t. 146, p. 1263.  
thol. Méd. expérim., 1947, t. 18, suppl. 2.

Techniques. — A un volume donné d'actinomycétine concentrée et dialysée, on ajoute une quantité déterminée de cellules microbiennes, mesurée en poids sec contenu dans le volume final. Les substrats microbiens servant à l'adsorption sont : *S. aureus* ou *E. coli*, tantôt vivants, tantôt tués par chauffage de 3 minutes à 100°. L'adsorption est réalisée dans des conditions bien déterminées de pH et de force ionique, au moyen de divers tampons (acétate Na-acide acétique ; orthophosphates mono- et bi-basiques ; véronal Na-HCl ; glycine-NaOH), couvrant le domaine de pH 6 à 10,4, où l'adsorption des substances colorées est nulle ou négligeable et où les deux types d'activité bactériolytique sont stables.

Après séjour en glacière pour obtenir l'équilibre d'adsorption, la suspension bactérienne est centrifugée à froid ; les liquides surnageants sont recueillis et dialysés ; enfin, leurs activités lytiques sont mesurées selon les techniques antérieurement décrites (1, 2).

ISOTHERMES D'ADSORPTION A 0°C SUR SUBSTRATS MICROBIENS (pH 7,3)

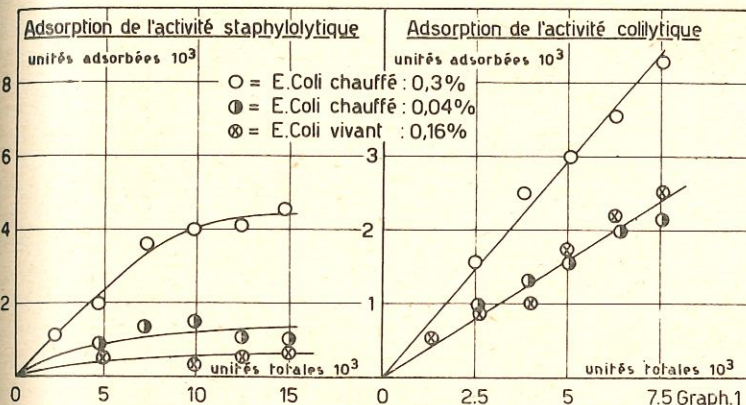


Fig. 1.

Résultats expérimentaux. — 1) *E. coli* et *S. aureus* adsorbent, l'un et l'autre, l'activité collytique comme l'activité staphylolytique (fig. 1 et 2).

2) L'adsorption n'est efficacement réalisée qu'à force ionique faible. A pH 7,3 (tampon orthophosphate), et en présence d'une grande quantité de corps microbiens (1,5 p. 100), l'adsorption de l'activité collytique est indépendante de la force ionique entre les limites 0,01 et 0,28. Au contraire, dans les mêmes conditions, l'adsorption de l'activité staphylolytique, appréciable à force ionique très faible, est pratiquement nulle lorsque  $\mu = 0,28$ . C'est pour cette raison que les isothermes d'adsorption, dont la figure 1 donne un exemple, ont été obtenus à  $\mu = 0,02$  et pH 7,3. De même, les résultats de trois adsorptions successives, représentées à la figure 2, ont été obtenus à  $\mu = 0,05$  environ.

3) L'adsorption des deux types d'activité est optimale pour un pH voisin de 9,0 (fig. 2).

4) Contrairement aux résultats rapportés par Tai et von Heyningen (3) à propos de l'adsorption de l'activité colilytique par *E. coli*, nous avons constaté que les corps microbiens non chauffés présentent un pouvoir d'adsorption non négligeable, mais cependant plus faible qu'après chauffage (fig. 1).

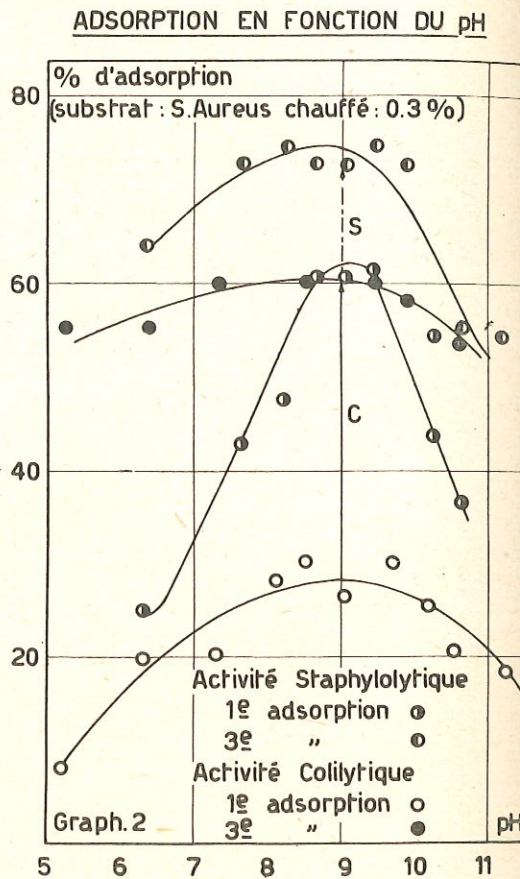


Fig. 2.

5) Chaque substrat présente une capacité d'adsorption plus grande pour le principe lytique homologue et atteint un état proche de la saturation avec une moindre quantité de principe hétérologue (fig. 1 et 2).

(3) T. Y. Tai et W. E. van Heyningen, *J. gener. Microbiol.*, 1951, t. 5, p. 110.

6) En réalité, l'activité lytique homologue est adsorbée. En effet, en utilisant des actinomycètes à activité colilytique/activité staphylolytique, par exemple, que, plus le titre colilytique est élevé, plus le pourcentage d'adsorption de l'activité staphylolytique par *E. coli* est élevé. Cette observation est illustrée également par les résultats obtenus lors de successive (fig. 2).

7) Les principes actifs adsorbés sur substrat sont désorbés à 0° et à force ionique élevée. L'addition de NaCl aux tampons précités. Le substrat est conservé au froid et leurs activités lytiques sont mesurées.

8) Incolores et limpides avant dialyse, après celle-ci, un trouble d'autant plus accentué est réalisé en milieu plus acide. Celui-ci est dû à l'addition d'électrolytes. Après désorption en milieu acide, les désorbats restent limpides après dialyse.

9) L'activité colilytique du désorbat est mesurée. Cette mesure a été faite à pH 3,5 ou 10,6. Par contre, la désorption n'est appréciable que si l'opération est faite en milieu alcalin.

10) Par adsorption sur bactéries chauffées, l'adsorption est faible, suivie de désorption à pH 10,6 ou 3,5. On récolte le principe colilytique purifié à 100%. Quant à la purification du principe staphylolytique, dans les mêmes conditions, elle atteint un rendement de 100%. La désorption est faite à pH 10,6, mais la mesure est faite à pH 3,5.

**Conclusions.** — 1) La dualité des principes staphylolytique, de l'actinomycétine est démontrée sur silica-gel ou sur bactéries.

2) Aucun système : adsorbant minéral ne permet d'obtenir une purification satisfaisante de l'actinomycétine.

3) Les substrats microbiens frais, mais non chauffés, présentent, pour les deux types d'activité lytique, une capacité élevée, qui s'exerce toutefois préférentiellement pour l'activité lytique homologue.

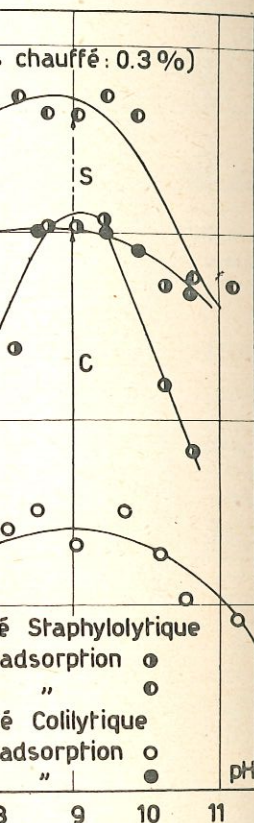
4) L'adsorption de l'actinomycétine sur substrats chauffés, à pH 9,0 environ et force ionique élevée, en milieu alcalin et force ionique élevée, permet d'obtenir des solutions bactériolytiquement actives incolores et limpides (\*).

(Laboratoires de Microbiologie générale, Université de Liège et C.R.P.A., Directeur : M. J. Van der Auwera)

(\*) Nous remercions l'Institut pour l'Étude des Problèmes Scientifiques dans l'Industrie et l'Agriculture et des Produits chimiques du Marly pour le permis de poursuivre ce travail.

l'activité est optimale pour un pH  
 rapportés par Tai et von Heyningen  
 activité colilytique par *E. coli*, nous  
 microbiens non chauffés présentent un  
 able, mais cependant plus faible

### FONCTION DU pH



capacité d'adsorption plus grande  
 et atteint un état proche de la  
 tité de principe hétérologue (fig. 1

ngen, *J. gener. Microbiol.*, 1951, t. 5,

6) En réalité, l'activité lytique homologue est préférentiellement adsorbée. En effet, en utilisant des actinomycétines possédant des rapports activité colilytique/activité staphylolytique différents, on constate, par exemple, que, plus le titre colilytique est élevé, plus l'adsorption de l'activité staphylolytique par *E. coli* est faible. Cette observation est illustrée également par les expériences d'adsorptions successives (fig. 2).

7) Les principes actifs adsorbés sur substrats microbiens peuvent être désorbés à 0° et à force ionique élevée ( $\mu = 1$ ), obtenue par addition de NaCl aux tampons précités. Les désorbats sont dialysés à froid et leurs activités lytiques sont mesurées.

8) Incolores et limpides avant dialyse, les désorbats présentent, après celle-ci, un trouble d'autant plus accentué que la désorption a été réalisée en milieu plus acide. Celui-ci disparaît d'ailleurs par addition d'électrolytes. Après désorption en milieu neutre ou alcalin, les désorbats restent limpides après dialyse.

9) L'activité colilytique du désorbat est la même, que la désorption ait été faite à pH 3,5 ou 10,6. Par contre, l'activité staphylolytique désorbée n'est appréciable que si l'opération est effectuée en milieu alcalin.

10) Par adsorption sur bactéries chauffées, à pH 9,2 et force ionique faible, suivie de désorption à pH 10,6 ou 3,5 et force ionique élevée, on récolte le principe colilytique purifié avec un rendement de 50 p. 100. Quant à la purification du principe staphylolytique, dans les mêmes conditions, elle atteint un rendement de 30 p. 100 environ, si la désorption est faite à pH 10,6, mais de 4 p. 100 seulement, si elle est faite à pH 3,5.

*Conclusions.* — 1) La dualité des principes actifs, colilytique et staphylolytique, de l'actinomycétine est démontrée par adsorption sur silica-gel ou sur bactéries.

2) Aucun système : adsorbant minéral/éluant ne nous a permis d'obtenir une purification satisfaisante des principes lytiques.

3) Les substrats microbiens frais, mais davantage après chauffage, présentent, pour les deux types d'activité, une capacité d'adsorption élevée, qui s'exerce toutefois préférentiellement sur l'activité homologue.

4) L'adsorption de l'actinomycétine par les corps microbiens chauffés, à pH 9,0 environ et force ionique faible, suivie de désorption en milieu alcalin et force ionique élevée, permet d'obtenir des solutions bactériolytiquement actives incolores, substantiellement purifiées (\*).

(Laboratoires de Microbiologie générale et médicale,  
 Université de Liège et C.R.P.A., Directeur : M. Maurice Welsch).

(\*) Nous remercions l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture et la Société belge de l'Azote et des Produits chimiques du Marly pour leur aide financière qui nous a permis de poursuivre ce travail.