

RECHERCHES SUR LA PHYTASE

III. ESSAIS DE SÉPARATION DE L'ACTIVITÉ GLYCÉROPHOSPHATASIQUE
ET DE L'ACTIVITÉ PHYTASIQUE DU SON DE BLÉ

par

JEAN COURTOIS

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris (France)

Nos précédentes recherches¹ sur les cinétiques d'hydrolyse du β -glycérophosphate (G) et de l'inositohexaphosphate (I) par le son de Blé nous avaient amenés à proposer l'interprétation suivante : le son de Blé renfermerait deux phosphatases distinctes : a) une phosphatase banale active sur G et inactive sur I ; b) une phosphatase à champ d'action plus étendu, sorte de „superphosphatase” que nous proposons de dénommer *phytophosphatase* active à la fois sur G et sur I.

Les essais du mémoire précédent ne permettaient pas de rejeter totalement l'éventualité d'une phytase très spécifique active sur I et inactive sur G.

Dans le but de préciser ce problème nous avons appliqué au son de Blé les principales techniques de purification et séparation des enzymes.

Nous exposerons tout d'abord les résultats obtenus et discuterons ensuite les conclusions à en tirer.

Protocole des essais.

Nous avons déterminé l'activité des diverses préparations en les faisant agir soit sur le glycérophosphate de sodium (G), soit sur l'inositohexaphosphate de sodium (I). Nous opposons à la préparation d'enzyme : 5 ml de substrat M/10 en acide phosphorique estérifié et amené à p_H 5.2, 5 ml de tampon acide acétique-acétate de sodium M/1 de p_H 5.2 et de l'eau distillée q.s. pour 50 ml. Après 24 heures de réaction à 37° en présence de quelques gouttes de toluène, l'acide phosphorique libéré est dosé par notre technique habituelle^{1, 2, 3}.

Nous définissons arbitrairement l'activité diastasique par le nombre de milligrammes de phosphore libéré sous forme d'acide phosphorique dans les conditions de l'expérience. Pour la clarté de l'exposé nous nommerons glycérophosphatase l'enzyme hydrolysant G et phytase celui hydrolysant I, ceci sans préjuger de l'identité ou de la non-identité des deux enzymes.

I. FRACTIONNEMENTS PAR RELARGAGE

1. *par le sulfate d'ammonium.*

Dans le Tableau I nous indiquons les résultats obtenus avec une macération de son relarguée, les précipités ont été redissous dans 20 ml d'eau. A 33 % * le relargat

* Pour les enzymes relargués : % représente le pourcentage de solution saturée à 0° du sel dans le milieu réactionnel.

hydrolyse nettement G et faiblement I ; par contre à 50 et 75 % l'enzyme, nettement plus actif, hydrolyse I plus rapidement que G ; on peut donc considérer que les deux enzymes sont alors totalement précipités.

a. *première fraction.* Il apparaît que la glycérophosphatase est relarguée plus facilement que la phytase ; nous avons tout d'abord étudié le précipité A R* = 8 g.

TABLEAU I

RELARGAGE FRACTIONNÉ PAR LE SULFATE D'AMMONIUM, LES CHIFFRES EXPRIMENT LES ACTIVITÉS DIASTASIQUES

Pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium pour lequel le précipité a été recueilli		33	50	75	100
Activité glycérophosphatasique	1 ml	0.45	4.7	8.1	infime
	5 ml	1.8	10.8	14.9	infime
Activité phytasique	1 ml	minime	5.0	11.25	infime
	5 ml	minime	11.25	13.5	infime

obtenu par relargage à 33 %. Repris par l'eau il laisse 1.35 g de résidu insoluble, peu actif G : 2.7 — I : infime. La fraction soluble est précipitée par 4 volumes d'acétone : préparation A₁ — R = 3.50 g. Ce dernier repris par l'eau laisse un résidu insoluble peu actif G : 1.8 — I : 1, la partie soluble hydrolyse G 5 fois plus rapidement que I.

Il est ainsi possible de séparer du son des préparations hydrolysant G plus rapidement que I, tandis que la macération de son dédouble I plus rapidement que G. Ces préparations A se comportent ainsi comme des phosphatases banales ; nous avons déterminé le p_H optimum de la fraction soluble de A₁ (Courbe 1).

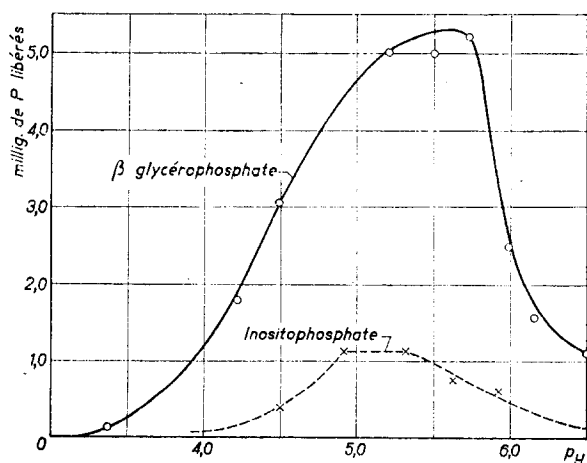


Fig. 1. Activité en fonction du pH de la préparation diastasique obtenue en relarguant la macération de son par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation.

10 ml substrat $\frac{M}{10}$ en P esterifié
suspension enzyme filtré à 0.20 g
% 10 ml tampon et eau distillée
q s p 50 ml 3 jours à 37°.

+ - - - - inositolphosphate
O ——— glycérophosphate

* Les rendements R sont exprimés en g de préparation fermentaire desséchée dans le vide sulfurique rapportés à 1 kg du son utilisé ; ces préparations renferment parfois une certaine quantité du sel employé pour les relarguer.

Les courbes d'activité diffèrent légèrement de celles obtenues avec la macération de son¹; avec A₁ le p_H optimum de la phytase est moins saillant et situé dans une zone un peu plus acide : 5.0—5.2 au lieu de 5.5—6.0. Inversement le p_H optimum de la glycérophosphatase est un peu plus accentué et situé en milieu moins acide (5.5—5.8 au lieu de 4.8—5.0).

Dans l'ensemble on peut considérer que la préparation relarguée à 33 % se comporte comme une phosphatase banale du type II (4) et diffère nettement de l'enzyme non relargué.

b. *deuxième fraction.* Après élimination du précipité à 33 %, nous relarguons à 66 % le précipité B; ce dernier, repris par l'eau, laisse un résidu peu actif, la partie soluble est traitée par 4 volumes d'acétone : (précipité B₁ R = 37.50 g).

Nous avons tenté de le fractionner par de nouveaux relargages. 3 g de B₁ sont suspendus dans 50 ml d'eau distillée.

a. *partie soluble.* A 33 % nous obtenons 0.2 g de précipité 0.01 g : G : 5.5 — I : 6.0 — 0.03 g G : 10.0 — I : 14.0 après filtration 1.20 g précipitent à 66 % : 0.008 g — G : 4.0 — I : 9.0, 0.03 g — G : 8.0 — I : 15.5.

b. *résidu non dissous.* Nous le traitons par 50 ml d'eau, résidu insoluble G : 5.6 — I : 10.0 — précipité à 33 % G : 1.35 — I : 1.8 — à 66 % G : 2.7 — I : 3.5.

Dans l'ensemble ces nouveaux fractionnements n'ont pas permis d'obtenir une préparation où le rapport des activités sur G et I soit modifié d'une façon appréciable. Tout se passe comme si nous étions en présence d'une phytosphatase homogène active à la fois sur G et I. En portant 5 minutes à diverses températures une solution de la préparation B₁ nous avons pu constater que les activités vis-à-vis de G et I disparaissent d'une façon parallèle (Tableau II). Des essais similaires avec la macération de son nous avaient montré (1) qu'après inactivation de la phytase il persistait une

TABLEAU II

INACTIVATION THERMIQUE DES ENZYMES PURIFIÉS

Température de l'essai		60°	65°	70°	72°	74°	76°
Pourcentage d'inactivation *	Glycérophosphatase	5	9	31	80	95	95
	Phytase	20	22	45	86	95	95

* Déterminé par rapport à une préparation diastasique témoin non chauffée.

légère activité glycérophosphatasique. Nous avons interprété ces résultats en supposant que la phosphatase banale n'est pas totalement détruite après inactivation totale de la phytosphatase associée. Précisément la préparation B₁, qui apparaît être débarrassée de la phosphatase banale préalablement relarguée, se comporte comme si elle ne contenait qu'un seul enzyme : la phytosphatase.

2. *par le sulfate de magnésium.*

A 50 % nous obtenons un précipité un peu plus actif sur G que sur I : G : 7.7 — I : 5.4. Tout se passe comme si le son renfermait une phosphatase banale plus facilement relarguée par les sels que la phytosphatase.

Après élimination de ce précipité peu actif MgSO₄ à 100 % précipite la pré-

paration D, reprise par l'eau, dialysée, filtrée et traitée par 4 volumes d'acétone ($R = 22.4$) 0.01 g G : 1.35 — I : 4.0 ; 0.05 g G : 4.0 — I : 8.0.

De même qu'avec $(NH_4)_2SO_4$ la fraction à caractère globulinique est plus active sur I que sur G.

3. par $MgSO_4$ et $(NH_4)_2SO_4$.

La préparation D est reprise par l'eau et fractionnée par $(NH_4)_2SO_4$. 12 % sont précipités au 1/3 de saturation 0.01 g — G : 2.25 — I : 0.7 ; 0.04 g. G : 6.5 — I : 5.4. Là encore le précipité paraît renfermer une certaine proportion de phosphatase banale plus aisément relargable.

A 66 % précipite la préparation E (70 % du poids de D) ayant les caractères de la phytosphatase.

0.01 g G : 2.5 — I : 7.5 ; 0.04 g G : 6.3 — I : 13.5.

II. FRACTIONNEMENTS PAR PRÉCIPITATION ACÉTONIQUE

Nous avons précipité par l'acétone à la glacière certaines des préparations obtenues par relargage.

1. Enzyme précipité par $(NH_4)_2SO_4$ à 66 % après élimination du précipité à 33 % cette opération étant répétée deux fois.

a. acétone à 50 % (préparation F) 0.002 g — G : 2.7 — I : 5.2 ; 0.008 g — G : 5.4 I : 13.0. Cette préparation F est l'une des plus actives par rapport au poids de résidu sec que nous ayons obtenu.

b. acétone entre 50 et 66 % G : 1.4 — I : 2.7, les précipités obtenus par addition d'acétone au filtrat sont inactifs.

2. Préparation E relarguée par $MgSO_4$ à 100 %, puis $(NH_4)_2SO_4$ à 66 %.

a. Acétone à 55 %. Le précipité est très actif G : 8.6 — I : 13.5.

b. Acétone entre 55 et 66 % G : 3,9 — I : 1.8. En ajoutant de l'acétone au filtrat, les précipités sont inactifs.

Dans l'ensemble ces fractionnements par l'acétone n'ont pas permis d'accroître l'activité phytasique par rapport à l'activité glycérophosphatasique de préparations déjà purifiées. Les précipités obtenus lorsque l'acétone provoque une opalescence persistante dans la solution se sont révélés très actifs.

III. ESSAIS DE PURIFICATION PAR ADSORPTION ET ÉLUTION

En vue de pouvoir reproduire éventuellement nos essais nous avons standardisé notre technique opératoire. Nous agitions mécaniquement l'adsorbant pendant une heure avec la préparation diastasique tamponnée¹. Après centrifugation nous déterminons l'activité du liquide surnageant L et d'une fraction de l'adsorbant A suspendu dans de l'eau. Nous avons élué soit par une solution de phytinate de sodium de pH 8.0, soit par une solution ammoniacale tamponnée² ; l'adsorbant délayé dans la solution est agité mécaniquement pendant une heure, puis laissé en contact 6 heures à la glacière. Après centrifugation nous déterminons l'activité de la préparation éluée E ajustée à

¹ Lorsque nous ne spécifions pas le pH nous opérons à pH 5.2.

² Chlorure d'ammonium 5 g — solution d'ammoniaque à 20 % 2.5 ml — eau distillée 250 ml.

pH 5.2 et celle de l'enzyme encore retenu par l'adsorbant R. Nos essais ont été réalisés avec certaines des préparations obtenues par relargage ou précipitation acétonique.

1. *Enzyme relargué par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 33 % de saturation.*

A pH 5.2 la phytase et la glycérophosphatase de la préparation A ne sont pas adsorbées sur terre d'infusoires ou alumine pour chromatographie (RHÔNE-POULENC), elles sont par contre fixées sur l'alumine C γ de WILLSTÄTTER¹, l'adsorption de la phytase est un peu plus accentuée que celle de la glycérophosphatase.

LIQUIDE SURNAGEANT APRÈS ACTION DE L'ALUMINE C γ

	Témoin	1 ml Alumine	5 ml Alumine
Activité sur G	2.25	2.0	1.35
Activité sur I	1.35	0.9	0.22

2. *Enzyme relargué par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 33 et 66 %.*

La phytase et la glycérophosphatase de la préparation B ne sont pas adsorbées sur terre d'infusoires et alumine pour chromatographie, elles sont retenues d'une façon équivalente par l'alumine C γ .

Les enzymes purifiés par reprise à l'eau et précipitation acétonique se montrent bien plus aisément adsorbables. A pH 5.2 la phytase et la glycérophosphatase sont fixées totalement par le tonsil ou la terre d'infusoires. L'alumine C γ ne les adsorbe pas à pH 4.0 et les fixe presque totalement à pH 6.0.

Nous avons réalisé diverses adsorptions et éluions.

a. *Adsorption sur alumine C γ* = L. G = 8.1 — I = 12.2, élution par le phytinate E avant dialyse G = 1.8 — I = 7.0 après dialyse G = 0.7 — I = 1.6 R. G = 0.7 — I = 0.9.

Le liquide surnageant après action de l'alumine est traité par le tonsil L₁ G = 6.3 — I = 11.2, puis élué par le phytinate E avant dialyse G = 0.9 — I = 2.7, après dialyse G = 0.25 I = 0.9 R. G = 0.25 I = 0.45.

b. *Adsorption sur terre d'infusoires*, élution par le phytinate et dialyse E — G = 5.4 — I = 10.3. Le liquide surnageant après adsorption est traité par l'alumine C γ , L₁ G = 12.5 — I = 14.8. L'alumine est éluee par la solution ammoniacale E₁ : G = 1.35 — I = 0.5. Après élution les 2 adsorbants sont inactifs sur G et I.

La préparation adsorbée sur terre d'infusoires et éluee par le phytinate est à nouveau adsorbée sur terre d'infusoires, puis éluee par la solution ammoniacale L₂ G = 0.45 — I = 0.25 ; E₂ G = 1.12 — I = 2.25.

c. *Adsorption sur terre d'infusoires*, élution par la solution ammoniacale E G = 3.6 — I = 9.0 ; nous répétons la même opération sur l'éluat L₁ G = 0.12 — I = 0.24 — E₁ G = 0.67 — I = 1.12. Le liquide surnageant après la première adsorption est dilué, la dilution favorise l'adsorption, car après action d'une nouvelle quantité de terre d'infusoires, la glycérophosphatase et la phytase sont totalement adsorbées ; nous

¹ L'alumine C γ est un médiocre adsorbant des phosphatases du son, par contre, la préparation utilisée adsorbe totalement la phosphatase d'Amande.

éluons par la solution ammoniacale ; c'est la préparation la plus active obtenue par élution $G = 5.85$ — $I = 10.8$.

d. *Adsorption sur terre d'infusoires* L $G = 2.0$ — $I = 4.7$. élution par la solution ammoniacale E $G = 1.1$ — $I = 2.2$. Le liquide surnageant après la première adsorption est dilué et divisé en 2 fractions : la première est adsorbée sur tonsil et élue par la solution ammoniacale L_1 : $G = 0.9$ — $I = 1.55$; E_1 : $G = 0.7$ — $I = 1.8$; la seconde est adsorbée sur terre d'infusoires et élue par la solution ammoniacale L_1 : $G = 0.12$ — $I = 0.22$ — E_2 : $G = 3.1$ — $I = 7.2$. Sur la même préparation la terre d'infusoires est un meilleur adsorbant que le tonsil et permet d'obtenir après élution une solution nettement plus active.

e. Dans un essai similaire à d l'élution par le phytinate donne des préparations plus actives sur I que sur G .

3. *Enzyme obtenu par deux relargages successifs par $(NH_4)_2SO_4$ entre 33 et 66 %* reprise par l'eau et précipitation par volume égal d'acétone. Traitement par l'alumine pour chromatographie L : $G = 2.2$ — $I = 10.3$, élution par la solution ammoniacale E : $G = 0.2$ — $I = 0.3$. Il n'y a que très peu d'enzyme fixé. Le liquide surnageant après action de l'alumine est traité par la terre d'infusoires qui adsorbe totalement les deux enzymes, qui n'ont pu être élués par la solution ammoniacale.

Au cours de tous ces essais la phytase et la glycérophosphatase sont adsorbées ou éluées d'une façon presque identique ; il n'a pas été possible de modifier d'une façon appréciable le rapport des activités sur G et I , le phytinate n'a pas provoqué une élution plus sélective que la solution ammoniacale.

IV. INACTIVATION EN FONCTION DU TEMPS DE PRÉPARATIONS PURIFIÉES

La conservation de certaines préparations fermentaires renfermant plusieurs enzymes distincts s'accompagne parfois de l'inactivation sélective de certains de ces enzymes BRIDEL et M^{lle} DESMAREST^{5, 6}. Nous avons conservé sous toluène à la température du laboratoire quelques-unes des solutions diastasiques utilisées ; nous n'avons jamais observé de différences marquées entre l'inactivation de la glycérophosphatase et celle de la phytase.

Après deux mois une solution du relargat par $(NH_4)_2SO_4$ à 33 % est inactive sur G et I , avec le relargat à 50 %, l'activité s'abaisse de $G = 4.7$ — $I = 5.0$ à $G = 0.67$ — $I = 1.57$.

L'enzyme relargué par $(NH_4)_2SO_4$ à 66 %, puis à nouveau à 33 %, a une activité initiale de $G = 5.5$ — $I = 5.0$, après 70 jours $G = 1.8$ — $I = 1.35$.

Enzyme relargué à 66 % après élimination du précipité à 33 % activité initiale $G = 3.6$ — $I = 8.1$; après 10 jours $G = 3.1$ — $I = 6.7$; après 25 jours $G = 2.5$ — $I = 5.8$; après 70 jours $G = 0.9$ — $I = 3.6$. Avec le même enzyme relargué une seconde fois dans les mêmes conditions : activité initiale $G = 4.0$ — $I = 9.0$; après 2 mois $G = 0.25$ — $I = 1.10$.

RÉSUMÉ

Nous avons appliqué au son de blé les techniques usuelles de séparation et purification des enzymes, nous préoccupant presque exclusivement de comparer les activités sur G (β -glycérophosphate) et sur I (inositohexaphosphate).

Des 57 préparations obtenues par les techniques les plus diverses, aucune n'a

hydrolysé exclusivement un seul des deux substrats ; 41 préparations, dont toutes celles d'activité élevée, se comportent comme la macération de son et hydrolysent I 2 à 3 fois plus rapidement que G. 8 préparations, d'activité moyenne, dédoublent I et G à des vitesses voisines ; enfin 8 préparations ont hydrolysé G plus rapidement que I. Ces dernières préparations sont en général peu actives, elles paraissent contenir une phosphatase banale hydrolysant G sans dédoubler I mélangée à un peu de phytophosphatase hydrolysant à la fois G et I. Cette phosphatase banale est plus aisément relarguée par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et MgSO_4 que la phytophosphatase associée. Les préparations riches en phytophosphatase sont les plus actives ; il a été impossible d'en séparer une fraction active sur I seul ou même considérablement plus active sur I que sur G. L'inactivation par chauffage ou au cours de la conservation, les essais de relargage fractionné par les sels, de précipitation acétonique fractionnée, les multiples opérations d'adsorption et élution sont en accord avec l'existence d'une phytophosphatase active à la fois sur G et I. Nous n'avons pu mettre en évidence aucun fait favorable à l'existence d'une phytase spécifique hydrolysant I sans dédoubler G. Tout se passe donc comme si le son de blé renfermait une phytophosphatase d'activité notable associée à une phosphatase banale peu active.

SUMMARY

We have applied to the wheat bran the customary techniques of separation and purification of the enzymes, meanwhile concentrating almost exclusively on comparing the activities on G (β -glycerophosphate) and I (inositohexaphosphate).

Of these preparations obtained by various methods none hydrolyses exclusively into two substrates ; 41 preparations, all of high activity, behave as macerated bran, and hydrolyse I two or three times as rapidly as G.

8 preparations, of medium activity, split I and G almost equally fast ; finally 8 preparations hydrolysed G faster than I. The latter are generally rather inactive ; they seem to contain a common phosphatase that hydrolyses G without splitting I and that is mixed with some phytophosphatase that simultaneously hydrolyses G and I.

This common phosphatase is more easily salted out by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and MgSO_4 than the associated phytophosphatase.

Preparations rich in phytophosphatase are the most active ; it was impossible to separate from it a fraction active on I only, or even one considerably more active on I than on G.

Inactivating by means of heating or in the course of the preservation, attempts at fractional salting art, fractional precipitation by means of acetone, repeated adsorptions and elutions agree with the existence of a phytophosphatase active on G as well as I.

We have not been able to single out any evidence for the existence of a phytase that hydrolyses I specifically, but not G.

Everything occurs therefore as if bran would contain a phytophosphatase whose activity is considerable, associated with a common phosphatase that is not very active.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben die für die Abscheidung und Reinigung der Enzyme gebräuchlichen Methoden auf die Weizenkleie angewandt und uns dabei beinahe ausschliesslich mit der Vergleichung der Aktivitäten auf G (β -Glycerophosphat) und I (Inositohexaphosphat) befasst.

Keines der 57 mit den verschiedensten Methoden erhaltenen Präparate hat ausschliesslich eines der beiden Substrate hydrolysiert ; 41 Präparate, worunter sämtliche mit höherer Aktivität, verhalten sich wie die mazerierte Kleie und hydrolysieren I 2 bis 3 mal schneller als G. 8 Präparate mit mittlerer Aktivität spalten I und G beinahe ebenso schnell ; schliesslich wurde durch 8 Präparate G schneller hydrolysiert als I.

Letztere sind im allgemeinen wenig aktiv ; sie scheinen eine gewöhnliche Phosphatase zu enthalten, welche G hydrolysiert ohne I zu spalten ; diese gewöhnliche Phosphatase ist vermengt mit etwas Phytophosphatase, welche sowohl G als auch I hydrolysiert. Erstere

wird leichter durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und MgSO_4 ausgesalzt als die mit ihr vermengte Phytophosphatase. Die an Phytophosphatase reichen Präparate sind die aktivsten. Es ist uns nicht gelungen, eine Fraktion abzuscheiden, die auf I allein aktiv war, oder wenigstens wesentlich aktiver auf I war als auf G. Die durch Erhitzen oder im Laufe der Konservierung auftretende Inaktivierung, die durch fraktionierte Aussalzung und durch fraktionierte Ausfällung mit Aceton angestellten Versuche und die zahlreichen Adsorptions- und Eluierungsoperationen stimmen mit der Annahme des Vorhandenseins einer Phytophosphatase überein, die gleichzeitig auf G und I aktiv ist. Wir konnten keine einzige Tatsache feststellen, welche auf das Vorhandensein einer spezifischen Phytase hinweist, die I hydrolisiert ohne G zu spalten. Alles vollzieht sich also, als ob die Weizenkleie eine Phytophosphatase mit merklicher Aktivität enthält, die mit einer gewöhnlichen, wenig aktiven Phosphatase vermengt ist.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. FLEURY ET J. COURTOIS, *Biochim. Biophys. Acta*, **1** (1947) 256.
- ² J. COURTOIS, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **27**, (1945) 411.
- ³ P. FLEURY ET J. COURTOIS, *Enzymologia*, **1**, (1937) 377.
- ⁴ J. ROCHE ET J. COURTOIS, *Les phosphatases — Exposés annuels de biochimie médicale*, **4**, (1944) 259.
- ⁵ M. BRIDEL ET MELLE DESMAREST, *Journ. pharm. chim.* **8**, (1928) 153.
- ⁶ M. BRIDEL ET MELLE DESMAREST, *Journ. pharm. chim.* **8**, (1928) 201.

Reçu le 26 Mars 1946.