

237. Sur les enzymes amylolytiques II¹⁾.L'affinité entre enzyme et substratum pour quelques α -amylases

par P. Bernfeld et H. Studer-Pécha.

(10 IX 47)

Dans un travail précédent²⁾ nous avons pu montrer que lors de la dégradation α -amylatique de l'amylose une partie du substratum est soustraite à l'action de l'enzyme. En effet, des particules d'amylose s'agglomèrent en formant des submicrons qui sont résistants à l'action des amylases. Ce vieillissement a lieu au cours même de la réaction enzymatique. La partie de l'amylose qui résiste de cette façon à l' α -amylase dépend de la concentration de cette dernière. Aux très fortes concentrations d'enzyme le vieillissement est nul et la dégradation atteint 40 à 45 % des liaisons glucosidiques de l'amylose.

Nous avons vu en outre que les α -amylases de pancréas, de bactérie et de malt se comportent qualitativement d'une manière absolument analogue (voir les fig. 1, 2 et 3 du mémoire précédent²⁾). Mais on observe de grandes différences entre ces trois α -amylases au point de vue quantitatif. Les concentrations d'enzyme nécessaires pour supprimer le phénomène du vieillissement de l'amylose sont très différentes pour chacune des trois amylases. Ceci résulte des fig. 1 et 2 dans lesquelles nous avons résumé quelques essais du travail précédent²⁾. Les concentrations des amylases sont exprimées en activité

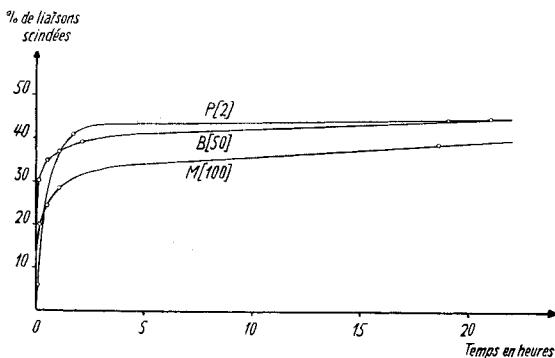


Fig. 1.

Dégradation de l'amylose par les α -amylases de
 pancréas à la concentration de $[2] = P [2]$
 bactérie à la concentration de $[50] = B [50]$
 malt à la concentration de $[100] = M [100]$

¹⁾ Communication précédente: K. H. Meyer, E. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 64 (1947).

²⁾ P. Bernfeld et H. Studer-Pécha, *Helv.* **30**, 1895 (1947).

par volume de solution. L' α -amylase de bactérie exige ainsi une concentration environ 25 fois plus grande que l' α -amylase de pancréas pour arriver à une scission de 40 à 45 % des liaisons de l'amylose (voir fig. 1). A concentrations égales l'efficacité des trois amylases à empêcher le vieillissement de l'amylose décroît dans l'ordre suivant: α -amylase de pancréas, α -amylase de bactérie, α -amylase de malt (voir fig. 2).

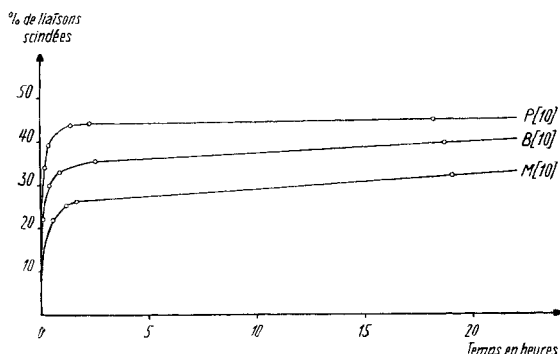


Fig. 2.

Dégradation de l'amylose par les α -amylases de
 pancréas à la concentration de [10] = P [10]
 bactérie à la concentration de [10] = B [10]
 malt à la concentration de [10] = M [10]

La différence dans le comportement de ces trois α -amylases qui possèdent pourtant la même spécificité chimique nous a amenés à étudier leur affinité pour le substratum.

L'affinité entre une enzyme et son substratum est définie comme suit ¹⁾–⁶⁾. Il est généralement admis qu'une réaction enzymatique se déroule en deux phases. Dans la première phase l'enzyme et le substratum se réunissent en formant une combinaison d'addition intermédiaire. Celle-ci est en équilibre de dissociation avec l'enzyme et le substratum libres. C'est la partie du substratum ainsi combinée qui subit dans la deuxième phase la transformation chimique. La vitesse de réaction v est proportionnelle à la concentration C du complexe entre l'enzyme et le substratum:

$$v = k_1 \cdot C \quad (1)$$

¹⁾ A. J. Brown, Soc. **81**, 373 (1902).

²⁾ L. Michaelis et M. L. Menten, Bioch. Z. **49**, 333 (1913).

³⁾ D. D. Van Slyke et G. E. Cullen, J. Biol. Chem. **19**, 211 (1914).

⁴⁾ G. E. Briggs et J. B. S. Haldane, Biochem. J. **19**, 338 (1925).

⁵⁾ E. A. Moelwyn-Hughes, dans Nord-Weidenhagen, Handbuch der Enzymologie 1940, 257.

⁶⁾ D. D. Van Slyke, Adv. Enzym. **2**, 33 (1942).

En appliquant la loi d'action des masses à la formation de ce complexe on obtient:

$$\frac{(E-C)(S-C)}{C} = K \quad (2)$$

où E et S sont les concentrations totales de l'enzyme et du substratum et C la concentration du complexe formé. K est la constante de dissociation de ce complexe, appelée aussi constante de *Michaelis*. La valeur $1/K$ exprime l'affinité entre l'enzyme et le substratum.

Pour une très grande concentration du substratum, où C devient négligeable vis-à-vis de S, on obtient:

$$\frac{(E-C)S}{C} = K \quad \text{ou} \quad C = \frac{E \cdot S}{K + S} \quad (3)$$

En augmentant encore la concentration du substratum, on arrive finalement à un stade où pratiquement toute l'enzyme est fixée dans le complexe intermédiaire, c'est-à-dire où $C = E$. La vitesse de réaction atteint alors une limite maximum V et l'équation 1 devient:

$$V = k_1 \cdot E \quad (4)$$

De 1, 3 et 4 on tire:

$$\frac{v}{V} = \frac{C}{E} = \frac{S}{K + S} \quad (5)$$

L'équation 5 permet de déterminer la constante K et l'affinité $1/(K^1)^2$.

Nous pouvons faire le même raisonnement pour le cas d'un grand excès d'enzyme par rapport au substratum et remplacer ainsi les équations 3, 4 et 5 par 3', 4' et 5':

$$\frac{E(S-C)}{C} = K \quad \text{ou} \quad C = \frac{S \cdot E}{K + E} \quad (3')$$

$$V' = k_1 \cdot S \quad (4')$$

$$\frac{v}{V'} = \frac{C}{S} = \frac{E}{K + E} \quad (5')$$

En général, la constante de *Michaelis* est déterminée par des essais effectués avec un grand excès de substratum (équation 5). Mais la détermination peut se faire aussi par des essais effectués avec un grand excès d'enzyme (équation 5').

Dans le présent travail nous avons mesuré la constante de *Michaelis* K pour les α -amylases de pancréas et de bactérie. En utilisant de l'amylose comme substratum il est nécessaire de travailler avec un grand excès d'enzyme pour éviter la formation de submicrons d'amylose³). Mais dans ce cas, la vitesse de dégradation est très grande, et il est difficile d'effectuer des mesures de cinétique avec une précision suffisante.

¹) L. *Michaelis* et M. L. *Menten*, Bioch. Z. **49**, 333 (1913).

²) H. *Lineweaver* et D. *Burk*, Am. Soc. **56**, 658 (1934).

³) P. *Bernfeld* et H. *Studer-Pécha*, Helv. **30**, 1895 (1947).

Nous avons alors deux possibilités: 1° abaisser sensiblement la température de la réaction (par exemple à 0°), ce qui diminue fortement la vitesse de réaction, mais influence aussi la constante de *Michaelis*, ou 2° remplacer l'amylose par un autre substratum dont les solutions sont stables, par exemple par l'amylopectine selon *Schoch*¹⁾, et effectuer la détermination de *K* selon la façon habituelle, c'est-à-dire avec un excès de substratum.

Nous avons choisi la seconde possibilité. Nos essais ont été effectués de la façon suivante: l'amylopectine de maïs selon *Schoch*¹⁾ est dégradée par les α -amylases de pancréas et de bactérie à une température de 20° C. Pour chacune des deux enzymes on effectue des séries de mesures dans lesquelles la concentration de l'amylopectine est variée entre 1,0 et 0,05 %, tout en maintenant constante la concentration de l'amylase. Le pouvoir réducteur est suivi par la méthode de *Sumner*²⁾³⁾ et la vitesse de réaction initiale *v* est déterminée par voie graphique. La constante de *Michaelis* est trouvée graphiquement d'après *Lineweaver* et *Burk*⁴⁾ en portant 1/*S* sur l'abscisse contre 1/*v* sur l'ordonnée. On obtient de cette manière une droite (voir fig. 3)

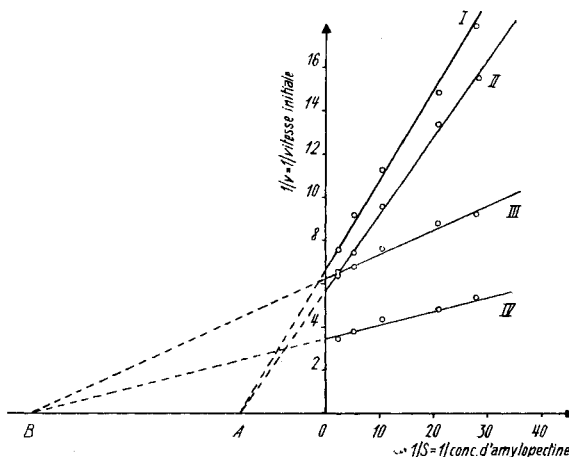


Fig. 3.

Détermination de la constante de *Michaelis* *K*.

- I = α -amylase de bactérie à la concentration de [10], pH 6,9
- II = α -amylase de bactérie à la concentration de [10], pH 5,3
- III = α -amylase de pancréas à la concentration de [10], pH 6,9
- IV = α -amylase de pancréas à la concentration de [20], pH 6,9
- O A = 1/*K* pour l' α -amylase de bactérie = $16 \times 100 \text{ cm}^3/\text{gr.}$
- O B = 1/*K* pour l' α -amylase de pancréas = $55 \times 100 \text{ cm}^3/\text{gr.}$

¹⁾ T. J. Schoch, Am. Soc. **64**, 2957 (1942).

²⁾ J. B. Sumner, J. Biol. Chem. **62**, 287 (1925).

³⁾ G. Noelling, thèse, Genève (1947).

⁴⁾ H. Lineweaver et D. Burk, Am. Soc. **56**, 658 (1934).

dont l'intersection sur l'ordonnée donne $1/V$ et l'intersection de sa prolongation sur l'abscisse donne la valeur numérique de $1/K$. En effet $1/v$ est une fonction de $1/S$, comme on peut le voir par transformation de l'équation 5:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K}{V} \cdot \frac{1}{S} \quad (6)$$

Il en résulte les valeurs suivantes pour la constante de *Michaelis*:

$K = 0,018$ pour l' α -amylase de pancréas, à pH 6,9.

$K = 0,063$ pour l' α -amylase de bactérie, aux pH 5,3 et 6,9.

K a la dimension d'une concentration qu'on exprime en général en moles (de substratum) par litre, et que nous avons exprimée ici en gr. par 100 cm^3 .

Il est très probable que l'affinité d'une α -amylase pour l'amylose et celle de la même amylase pour l'amylopectine sont égales ou au moins très rapprochées l'une de l'autre, si le poids moléculaire des deux polysaccharides est le même. En effet, notre amylopectine de maïs possède un poids moléculaire de 45000¹⁾ et l'amylose de maïs que nous avons utilisé dans le travail précédent²⁾ possède un poids moléculaire de 40000³⁾. Nous pouvons donc admettre que l' α -amylase de pancréas possède une affinité beaucoup plus grande que l' α -amylase de bactérie, aussi bien pour notre amylopectine que pour notre amylose.

Nous pouvons maintenant expliquer pourquoi les α -amylases de pancréas et de bactérie ont une efficacité différente à empêcher le vieillissement de l'amylose. Comme nous avons vu, la presque totalité de l'amylose est fixée dès le début de la réaction dans le complexe entre l'enzyme et le substratum, si la concentration d'enzyme est suffisamment grande. Les particules d'amylose sont de cette façon empêchées de former des submicrons et le vieillissement est supprimé. Or, il suffit d'une quantité plus petite de l'amylase à grande affinité pour fixer une certaine quantité d'amylose dans ce complexe que de l'amylase à petite affinité: l' α -amylase de pancréas doit être plus efficace que l' α -amylase de bactérie. Ceci a été en effet observé (voir fig. 1 et 2).

Le fait que l' α -amylase de malt est encore moins efficace à supprimer le vieillissement de l'amylose que les deux autres α -amylases nous permet de conclure que son affinité pour l'amylose est encore plus faible que l'affinité de l' α -amylase de bactérie. *Hopkins*⁴⁾ indique pour l' α -amylase de malt une constante d'affinité de 0,024 gr./100 cm^3 en utilisant de l'amidon comme substratum. Une comparaison de cette valeur avec les nôtres nous semble être difficile à cause de la différence du substratum, ainsi que de son poids moléculaire.

¹⁾ K. H. Meyer, G. Noelting et P. Bernfeld, Exper., sous presse.

²⁾ P. Bernfeld et H. Studer-Pécha, Helv. **30**, 1895 (1947).

³⁾ K. H. Meyer, W. Brentano et P. Bernfeld, Helv. **23**, 845 (1940).

⁴⁾ R. H. Hopkins, Adv. Enzym. **6**, 410 (1946); D. E. Dolby, thèse, Birmingham (1938).

Tandis que l'affinité pour le substratum est différente pour chacune de ces trois α -amylases, leur action sur le substratum semble être égale, c'est-à-dire qu'elles provoquent la même réaction chimique et qu'elles choisissent les mêmes liaisons sur le substratum. Il semble donc que les α -amylases de pancréas, de bactérie et de malt, tout en possédant le même groupement actif (par exemple le même groupe prosthétique ou la même coenzyme), sont constituées de protéines différentes, c'est-à-dire d'apoenzymes différentes.

RÉSUMÉ.

L'affinité de trois α -amylases pour leur substratum (amylose ou amylopectine) est différente. Elle décroît dans l'ordre suivant: α -amylase de pancréas, α -amylase de bactérie, α -amylase de malt.

Partie expérimentale.

Les préparations d'enzyme sont les mêmes que celles utilisées dans le travail précédent¹⁾. Le dosage de leur activité se fait dans les conditions qui y sont indiquées. Les concentrations en α -amylase sont exprimées de la même façon, c'est-à-dire en activité par volume. Nous désignons par [1] la concentration enzymatique suivante: 1 cm³ d'une solution d'enzyme, possédant dans nos conditions de dosage une activité de 1,50 mgr. de maltose, et dilué à 50 cm³.

Préparation de l'amylopectine. 10 gr. d'amidon de maïs dégraissé sont dissous selon Schoch²⁾ dans 1 litre d'eau par un traitement de 2 heures à 110° C dans l'autoclave en présence de 150 cm³ d'alcool n-butylque et de 50 cm³ d'alcool amylique. Puis la solution est lentement refroidie et conservée pendant 48 heures à une température de +3° C. On centrifuge alors une heure à 3000 tours/minute pour éliminer le précipité d'amylose qui s'est formé. La solution surnageante, faiblement trouble, est concentrée dans le vide jusqu'à une teneur en amylopectine de 0,67%. Ce traitement élimine en même temps les alcools. La solution peut être conservée à froid pendant plusieurs semaines.

La détermination de la constante de Michaelis.

Tous les essais se font dans une chambre dont la température est tenue constante à $20 \pm 1^\circ$ C. La variation de température observée pendant la durée d'une série d'essais ne dépassait jamais $\pm 0,3^\circ$. Toutes les solutions et tous les récipients ont été portés préalablement à la température de cette chambre.

α -amylase de pancréas. 25 cm³ de la solution d'amylopectine sont additionnés de 1,25 cm³ de NaOH n. Après un repos de 10 minutes on ajoute 1,55 cm³ de H₃PO₄ 1,6 n, contenant 1,4 mgr. de NaCl, puis 1 cm³ d'une solution d' α -amylase de pancréas à 0,5%, préalablement bouillie et filtrée, et enfin 1,2 cm³ d'une solution d'enzyme. La teneur de cette dernière en α -amylase est telle qu'elle porte à [10] la concentration d'enzyme dans le mélange de réaction, ou à [20] dans d'autres cas. On prélève des prises de 4 cm³ dans des éprouvettes et on arrête la réaction enzymatique à temps voulu (généralement après 60, 120, 180, 240 et 300 secondes exactement) par l'adjonction de 4 cm³ de la solution alcaline d'acide dinitrosalicylique (solution 3 pour le dosage d'activité, du mémoire précédent). On plonge les éprouvettes dans de l'eau bouillante pendant 5½ minutes, refroidit, dilue chaque prise par 16 cm³ d'eau et lit au photomètre contre un blanc sans enzyme traité dans les mêmes conditions.

On répète le même essai avec une solution d'amylopectine 2,5 fois plus diluée, puis avec une solution d'amylopectine 5 fois plus diluée, puis 10 fois et finalement 13 fois plus diluée.

¹⁾ P. Bernfeld et H. Studer-Pécha, Helv. **30**, 1895 (1947).

²⁾ T. J. Schoch, Am. Soc. **64**, 2957 (1942).

Les extinctions observées sont exprimées en mgr. de maltose d'après une courbe d'étalon, établie dans les mêmes conditions. En portant ces valeurs de réduction en fonction du temps on obtient pour chaque concentration d'amylopectine une courbe. L'inclinaison de ces courbes au temps $t = 0$ donne la vitesse initiale de réaction. Nous exprimons cette vitesse en mgr. de maltose par minute et par prise de 4 cm³.

α -amylase de bactérie à p_H 6,9. L'essai se fait de la même façon avec la seule différence qu'on ajoute 1 cm³ d'eau au lieu de la solution d'enzyme bouillie.

α -amylase de bactérie à p_H 5,3. 25 cm³ de la solution d'amylopectine sont additionnés de 1,25 cm³ de NaOH n. Après un repos de 10 minutes on ajoute 1,55 cm³ de CH₃COOH n, puis 1 cm³ d'eau et 1,2 cm³ d'enzyme. On poursuit l'essai de la même façon que pour l' α -amylase de pancréas.

Comme exemple, nous montrons dans la figure 4 les résultats d'une série d'essais

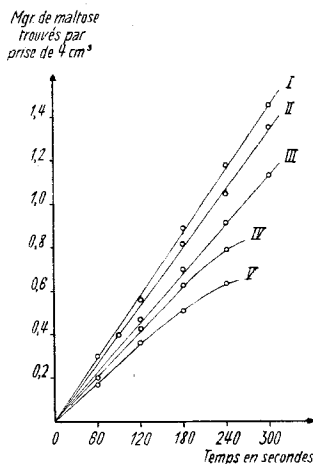


Fig. 4.

L'action de l' α -amylase de pancréas sur l'amylopectine à différentes concentrations.

- I = la concentration de l'amylopectine est de 0,465%
- II = la concentration de l'amylopectine est de 0,185%
- III = la concentration de l'amylopectine est de 0,093%
- IV = la concentration de l'amylopectine est de 0,047%
- V = la concentration de l'amylopectine est de 0,035%

effectués avec l' α -amylase de pancréas. Pour l' α -amylase de bactérie nous obtenons des figures analogues.

Dans la figure 3 les valeurs réciproques de vitesse initiale trouvées de cette façon pour les deux α -amylases sont portées en fonction des valeurs réciproques de la concentration d'amylopectine.

Nous remercions M. le Prof. K. H. Meyer de ses précieux conseils et de l'intérêt qu'il a porté à nos travaux.

Ces recherches ont été encouragées par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

Laboratoires de Chimie organique et
inorganique de l'Université de Genève.