

188. Sur les enzymes amylolytiques IV¹⁾.

Dosage de l'activité de l' α -amylase

par P. Bernfeld et Maria Fuld.

(22 VI 48)

Dans le présent travail nous décrivons une méthode de dosage de l'activité α -amylatique, à la fois simple et rapide. Cette méthode de dosage a été utilisée dans les travaux de notre laboratoire sur les α -amylases.

Elle consiste à faire agir la solution de l'enzyme pendant un temps donné (3 minutes) sur une solution d'amidon de *Zulkowski*, et à identifier la coloration à l'iode de cette solution avec une des quinze couleurs d'une échelle de comparaison. Etant donné l'instabilité de la coloration à l'iode des solutions d'amidon et de ses produits de dégradation, une échelle de couleurs de comparaison stables a été obtenue en mélangeant de façon appropriée les trois colorants suivants: carmin d'indigo, ponceau GR et brun p-sulfonique V. La méthode a été étalonnée par une série d'essais à des concentrations décroissantes d'enzyme, obtenues par dilution appropriée d'une solution de base d' α -amylase de bactérie cristallisée²⁾.

Nous avons en outre déterminé le pouvoir réducteur produit par l'action de l'enzyme sur l'amidon. Une mesure a été effectuée dans les conditions de notre dosage réductométrique des amylases¹⁾³⁾, afin de pouvoir comparer les résultats du dosage au moyen de la coloration à l'iode, à ceux du dosage réductométrique. D'autre part, pour exprimer en pourcentage d'hydrolyse la coloration à l'iode de l'amidon dégradé par l' α -amylase, nous avons effectué une série de mesures dans les conditions employées pour le dosage du changement de la coloration à l'iode.

La précision de la méthode de dosage est de $\pm 5\%$. Pour des mesures plus précises nous nous servons de la méthode réductométrique¹⁾³⁾.

Partie expérimentale.

Solutions:

1° Substratum à p_H 5,3: 1,0 gr. d'amidon soluble *Zulkowski* et 46,8 mgr. de $ClNa$ sont dissous dans environ 50 cm^3 d'eau; la solution est additionnée de 10 cm^3 de tampon d'acétate de p_H 5,3 et de force ionique $\mu = 0,60$, puis complétée à 100 cm^3 .

¹⁾ IIIme communication, *Helv.* **31**, 286 (1948).

²⁾ K. H. Meyer, M. Fuld et P. Bernfeld, *Exper.* **3**, 411 (1947).

³⁾ K. H. Meyer, E. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 64 (1947).

2^o Substratum à p_H 6,9: 1,0 gr. d'amidon soluble *Zulkowski* et 46,8 mgr. de ClNa sont dissous dans environ 50 cm³ d'eau; la solution est additionnée de 10 cm³ de tampon de phosphate de p_H 6,9 et de force ionique $\mu = 0,60$, puis complétée à 100 cm³.

3^o Acide acétique normal.

4^o Solution contenant 0,25 gr. de IK et 0,127 gr. de I₂ dans 100 cm³ d'eau.

5^o Solution alcaline d'acide dinitrosalicylique, voir ¹⁾ solution **2**.

Echelle de couleurs:

Solutions de base: **sol. A** contient 20 mgr. de carmin d'indigo dans 100 cm³ d'eau; **sol. B** contient 20 mgr. de ponceau GR (CIBA) dans 100 cm³ d'eau; **sol. C** contient 10 mgr. de brun p-sulfonique V (Sandoz) dans 100 cm³ d'eau. Elles sont mélangées selon les indications du tableau 1.

Tableau 1.

Echelle N°	Sol. A cm ³	Sol. B cm ³	Sol. C cm ³	H ₂ O cm ³	Couleur
1	10	0,3	—	—	bleu
2	10	1	—	—	
3	10	2	—	—	bleu-violacé
4	10	4	—	—	
5	10	6	—	—	violet
6	10	8	—	—	
7	10	10	—	—	pourpre
8	8	10	2	—	
9	6	10	4	—	rouge-pourpre
10	4	10	6	—	
11	2	10	8	—	rouge-brun
12	0,3	10	10	—	
13	—	2	10	5	brun
14	—	0,3	10	7	
15	—	—	10	10	

Ces solutions sont gardées dans des éprouvettes scellées, à l'abri de la lumière. Elles restent stables ainsi pendant plusieurs mois.

Mode opératoire:

La réaction se fait dans des éprouvettes du même diamètre que celles contenant les colorants de comparaison. 5 cm³ de **1** (pour les α -amylases de bactérie ou de malt) ou 5 cm³ de **2** (pour les α -amylases de pancréas ou de salive) sont additionnés à 20^o de 1 cm³ de la solution d'enzyme. Après 180 secondes on arrête la réaction par adjonction de 2 cm³ de **3**, puis on ajoute 10 gouttes de **4** et on dilue, si nécessaire, avec un peu d'eau jusqu'à égalité d'intensité avec la couleur correspondante de l'échelle. La comparaison se fait avantageusement à la lumière du jour. On détermine le numéro de l'échelle possédant une couleur identique, éventuellement en interpolant entre deux couleurs, et on trouve l'activité relative de l' α -amylase dans la deuxième colonne du tableau 2. L'activité relative d'une solution d' α -amylase donnant dans ces conditions une coloration à l'iode identique au numéro 11 de l'échelle est appelée arbitrairement activité 1.

¹⁾ Helv. 31, 288 (1948).

Mesures réductométriques:

1^o Comparaison à la méthode réductométrique: 1 cm³ d'une solution d' α -amylase de bactérie, possédant l'activité relative de 0,1, donne dans les conditions du dosage¹⁾ avec 1 cm³ d'une solution d'amidon de *Zulkowski* à 1% pendant 3 minutes à 20° un pouvoir réducteur correspondant à 0,63 mgr. de maltose.

Tableau 2.

I Numéro de la couleur de l'échelle	II Activité relative de la solution d' α -amylase	III Concentration en protéine pure de l'enzyme (amylase de bactérie) en γ/cm^3	IV Pourcentage des liaisons scindées dans l'amidon <i>Zulkowski</i>
2 *)	0	—	0
3	0,3	5,4	5
4	0,36	6,5	6,3
5	0,44	7,9	7,3
6	0,5	9,0	8,3
7	0,55	9,9	9
8	0,6	10,8	9,5
9	0,7	12,6	11,3
10	0,8	14,4	12,3
11	1	18,0	15
12	1,2	21,6	17
13	1,4	25,2	19,3
14	1,6	28,8	21,5
15	1,8	32,4	23,5

*) La couleur N° 1, qui correspond à l'amylose, n'intervient pas dans ce dosage.

2^o Rapport entre la coloration à l'iode et le pourcentage d'hydrolyse de l'amidon: 5 cm³ de 1 ont été additionnés à 20° de 1 cm³ de la solution d' α -amylase de bactérie. L'activité relative de cette solution a été dosée préalablement; elle est indiquée dans la colonne 2. Après 180 secondes, la réaction a été arrêtée en pipettant une partie aliquote de cette solution (de 0,2 à 2 cm³) dans une éprouvette contenant 2 cm³ de 5. Le volume a été complété à 4 cm³ par de l'eau, l'éprouvette plongée pendant 5 minutes dans de l'eau bouillante, puis refroidie dans un courant d'eau froide. Après dilution par 20 cm³ d'eau, l'absorption du colorant brun formé a été déterminée dans le colorimètre photo-électrique de *Klett-Summerson* en utilisant le filtre vert N° 54. Nous avons déduit de la valeur d'extinction ainsi obtenue la valeur d'extinction d'un essai à blanc effectué dans les mêmes conditions, mais sans enzyme. Cette différence a été exprimée en mgr. de maltose apparent, d'après une courbe étalon d'où nous avons calculé le degré d'hydrolyse de l'amidon de *Zulkowski*, c'est-à-dire le pourcentage des liaisons scindées. Ces valeurs sont données dans la quatrième colonne du tableau 2.

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

1) Helv. 31, 286 (1948).

RÉSUMÉ.

Une nouvelle méthode de dosage de l'activité α -amylatique a été décrite. Cette méthode simple et rapide est basée sur la comparaison de la coloration à l'iode de l'amidon dégradé par l'amylase, avec une échelle de couleurs stables.

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

189. Sur les enzymes amylolytiques V¹⁾.

**Comparaison de l'action enzymatique d' α -amylases
de diverses provenances**

par P. Bernfeld et Maria Fuld.

(22 VI 48)

Les α -amylases de pancréas de porc²⁾, de salive humaine³⁾ et de *Bacillus subtilis*⁴⁾ ont été obtenues à l'état pur et cristallin. Leur solubilité dans l'eau est différente, chacune cristallise dans une autre forme et l'optimum de leur action est situé à des p_H différents. En outre, elles possèdent des affinités différentes pour le substratum⁵⁾. Il est donc bien établi qu'il s'agit de substances de constitution chimique différente.

Le problème se pose alors de savoir si leur action enzymatique est véritablement la même. On sait que l'action des α -amylases se manifeste: 1^o par une rapide diminution de la viscosité d'un empois d'amidon, 2^o par un changement de la coloration à l'iode d'une solution d'amylopectine, et 3^o par une augmentation du pouvoir réducteur du substratum. L'augmentation du pouvoir réducteur mesure la scission des liaisons α -1,4-glucosidiques, quelle que soit leur position dans la molécule. La valeur réductrice mesure l'*action saccharogène*. Par contre, le changement de la coloration à l'iode dépend de l'endroit de la scission glucosidique dans la molécule. La scission d'une liaison à l'intérieur de la molécule produit deux molécules sensiblement plus petites et entraîne un changement de la coloration à l'iode. La scission d'une liaison à la périphérie de la

¹⁾ IVme communication, *Helv.* **31**, 1420 (1948).

²⁾ K. H. Meyer, E. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 64 (1947); *Exper.* **3**, 106 (1947).

³⁾ K. H. Meyer, E. H. Fischer, P. Bernfeld et A. Staub, *Exper.* **3**, 455 (1947).

⁴⁾ K. H. Meyer, M. Fuld et P. Bernfeld, *Exper.* **3**, 411 (1947).

⁵⁾ P. Bernfeld et H. Studer-Pécha, *Helv.* **30**, 1904 (1947).