

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).

molécule, par contre, ne diminue que peu le poids moléculaire et ne modifie guère la coloration à l'iode. Le changement de la coloration à l'iode mesure la diminution du poids moléculaire de l'amidon, c'est-à-dire l'action dextrinogène.

En exprimant le rapport: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène, il sera possible de voir si une α -amylase scinde de préférence des liaisons glucosidiques périphériques ou centrales.

Nous avons déterminé le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène pour les α -amylases suivantes: 1^o α -amylase de pancréas de porc cristallisée, 2^o α -amylase de pancréas humain cristallisée¹⁾, 3^o α -amylase de salive humaine cristallisée, 4^o α -amylase de *Bacillus subtilis* cristallisée et 5^o α -amylase de malt fortement enrichie. La concentration en substratum, lors de la réaction enzymatique, était la même dans les essais de détermination du pouvoir saccharogène et dans les essais de mesure du pouvoir dextrinogène; il en était de même de la concentration en ClNa et de la force ionique.

Nous avons trouvé que ce quotient est identique pour les cinq α -amylases. Par conséquent, leur action sur le substratum est identique.

Nous avons comparé l'action enzymatique de différentes amylases sur un substratum à poids moléculaire élevé, mais pendant leur réaction initiale seulement. Les produits finals de l'action α -amylatique sur l'amidon sont un mélange de dextrans possédant un degré de polymérisation moyen compris entre 3 et 6 restes de glucose. On sait que le degré de polymérisation moyen de ces dextrans varie selon l' α -amylase employée²⁾. Ce phénomène doit être attribué à la différence d'affinité de chacune de ces α -amylases pour le substratum car la réaction enzymatique s'arrête lorsque l'affinité pour le substratum devient trop petite, stade qui est atteint à des degrés de polymérisation différents selon l' α -amylase.

La β -amylase hydrolyse uniquement les liaisons α -1,4-glucosidiques voisines des groupes terminaux³⁾. En effet, nous trouvons que le rapport: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène est six fois plus grand pour la β -amylase que pour l' α -amylase. Il est évident qu'une α -amylase contenant de la β -amylase présentera un quotient plus élevé que l' α -amylase seule. La détermination de ce quotient sera donc très utile pour l'examen de la teneur, en β -amylase, d'une α -amylase. Nous avons trouvé qu'on peut déceler avec certitude 5% de β -amylase (pourcentage des deux amylases exprimé par leur activité

¹⁾ K. H. Meyer, E. H. Fischer, P. Bernfeld et F. Duckert, Arch. Biochem., sous presse.

²⁾ L. D. Beckord, E. Kneen et K. H. Lewis, Ind. Eng. Chem. **37**, 692 (1945).

³⁾ C. S. Hanes, Can. J. Res. **13** B, 185 (1935); New Phytologist **36**, 101, 189 (1937); E. Ohlsson, Z. physiol. Ch. **189**, 17 (1930).

mesurée par le pouvoir réducteur). L'ancienne méthode de *Wijsman*¹⁾, beaucoup moins sensible, est applicable seulement si la constante de diffusion de l' α -amylase est plus petite que celle de la β -amylase.

Partie expérimentale.

Solutions:

1° à 4°: voir solutions 1 à 4 de la communication précédente²⁾.

5° Solution alcaline d'acide dinitrosalicylique, voir ³⁾, solution 2.

6° Substratum p_H 5,3: 1,667 gr. d'amidon soluble *Zulkowski* et 78,0 mgr. de $ClNa$ sont dissous dans environ 50 cm³ d'eau; la solution est additionnée de 16,65 cm³ de tampon d'acétate de p_H 5,3 et de force ionique $\mu = 0,60$, puis complétée à 100 cm³.

7° Substratum p_H 6,9: 1,667 gr. d'amidon soluble *Zulkowski* et 78,0 mgr. de $ClNa$ sont dissous dans environ 50 cm³; on ajoute 16,65 cm³ de tampon de phosphate de p_H 6,9 et de force ionique $\mu = 0,60$, puis on complète à 100 cm³.

Enzymes:

Des solutions aqueuses des α -amylases cristallisées de pancréas de porc⁴⁾, de pancréas humain⁵⁾, de salive humaine⁶⁾, de *Bacillus subtilis*⁷⁾ et d' α -amylase de malt purifiée⁸⁾ ont été préparées, contenant chacune de 0,1 à 0,2 mgr. de protéine par cm³.

Une solution de β -amylase de patate cristallisée⁹⁾ a été faite, contenant de 0,1 à 0,2 mgr. de protéine par cm³.

Détermination du pouvoir dextrinogène des α -amylases:

Ces essais ont été effectués dans les conditions décrites dans la communication précédente⁴⁾ et avec les solutions 1 à 4.

Nous avons dilué les solutions des α -amylases de sorte que chacune d'elles possède, aux conditions de notre dosage, une activité relative de 0,1. Le pouvoir dextrinogène des α -amylases a été exprimé en activité relative (voir colonne 3 du tableau 1).

Détermination du pouvoir saccharogène des α -amylases:

1 cm³ de chacune des solutions d' α -amylase, possédant l'activité relative de 0,1, a été additionné à 20° de 1 cm³ de la solution du substratum 6 ou 7, selon le p_H désiré. La réaction a été interrompue après 180 secondes par l'addition de 2 cm³ de 5. L'éprouvette contenant la solution a été plongée pendant 5 minutes dans de l'eau bouillante, puis refroidie dans un courant d'eau froide; la solution a été ensuite diluée par 20 cm³ d'eau et l'extinction déterminée au colorimètre photoélectrique de *Klett-Summerson*, en utilisant le filtre vert N° 54. De la valeur obtenue nous avons déduit l'extinction d'un essai à blanc sans enzyme, traité dans les mêmes conditions. La différence des extinctions a été traduite en mgr. de maltose apparent, selon une courbe étalon.

¹⁾ *H. P. Wijsman*, Thèse Amsterdam 1889; *G. A. van Klinkenberg*, *Z. physiol. Ch.* **209**, 253 (1932).

²⁾ *Helv.* **31**, 1420 (1948).

³⁾ *Helv.* **31**, 288 (1948).

⁴⁾ *Helv.* **30**, 64 (1947).

⁵⁾ *Arch. Biochem.*, sous presse.

⁶⁾ *Exper.* **3**, 455 (1947).

⁷⁾ *Exper.* **3**, 411 (1947).

⁸⁾ A publier.

⁹⁾ *A. K. Balls*, *R. R. Thompson* et *M. K. Walden*, *J. Biol. Chem.* **163**, 571 (1946); nous remercions M. le Dr. *Balls* d'avoir bien voulu mettre à la disposition de notre laboratoire la β -amylase cristallisée.

Le pouvoir saccharogène des α -amylases a été exprimé par cette valeur de réduction en mgr. de maltose (voir colonne 4 du tableau 1).

Le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène est donné dans la colonne 5 du tableau 1.

Tableau 1.

Enzyme	P _H	pouv. dextr. *)	pouv. sacch. **)	pouv. sacch. pouv. dextr.
α -amylase de pancréas de porc crist. . . .	6,9	0,1	0,98	9,8
α -amylase de pancréas humain crist. . . .	6,9	0,1	0,97	9,7
α -amylase de salive humaine crist.	6,9	0,1	0,95	9,5
α -amylase de Bac. subtilis crist.	6,9	0,1	0,96	9,6
α -amylase de Bac. subtilis crist.	5,3	0,1	0,98	9,8
α -amylase de malt purifiée	6,9	0,1	0,97	9,7
α -amylase de malt purifiée	5,3	0,1	0,98	9,8
β -amylase de patate crist.	5,3	0,012	0,73	61
α -amylase de malt purifiée contenant 5% de β -amylase de patate crist.	5,3	0,1	1,025	10,25

*) Exprimé en activité relative.

**) Exprimé en mgr. de maltose.

Détermination du rapport: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène pour la β -amylase:

1 cm³ de la solution de β -amylase cristallisée a été ajouté à 20° à 5 cm³ de la solution de substratum 1. Après 180 secondes, 2 cm³ de 3 et 10 gouttes de 4 ont été ajoutés. La couleur était alors identique au numéro 8 de l'échelle de comparaison. L'activité relative était donc de 0,6.

1 cm³ d'une solution 50 fois plus diluée (activité relative = 0,012) a été ajouté à 20° à 1 cm³ de la solution de substratum 6. Après 180 secondes 2 cm³ de 5 ont été ajoutés et le pouvoir réducteur a été déterminé comme d'habitude. Il était de 0,73 mgr. de maltose.

L'influence de la β -amylase sur le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène de l' α -amylase:

Pour ces essais, nous avons préparé les solutions d'enzyme suivantes:

a: α -amylase de malt; 1 cm³ de cette solution, diluée 1 à 10, donnait avec 1 cm³ de la solution de substratum 6 en 3 minutes à 20° un pouvoir réducteur correspondant à 1,95 mgr. de maltose.

b: β -amylase de patate cristallisée; 1 cm³ de cette solution, non diluée, donnait dans les mêmes conditions 0,96 mgr. de maltose.

Nous avons mélangé 2 cm³ de la solution **a** avec 2 cm³ de la solution **b** et déterminé l'activité dextrinogène, puis l'activité saccharogène après dilution de 1 à 10. Les résultats se trouvent dans le tableau 1.

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

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

RÉSUMÉ.

L'augmentation du pouvoir réducteur et le changement de la coloration à l'iode, lors de l'action d' α -amylases de provenance différente sur l'amidon soluble, ont été mesurés et exprimés quantitativement. Le rapport de ces deux valeurs, c'est-à-dire le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène, est le même pour les α -amylases cristallisées de pancréas de porc, de pancréas humain, de salive humaine, de *Bacillus subtilis* et pour l' α -amylase de malt purifiée.

Il s'ensuit que toutes ces enzymes possèdent la même action, tout en étant des substances chimiquement différentes.

La détermination du quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène peut servir en outre à déceler la présence de β -amylase dans une solution d' α -amylase.

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

**190. Etudes sur les matières végétales volatiles LXVIII¹⁾.
Absorption de dérivés des ionones et des irones dans l'ultra-violet moyen**
par Yves-René Naves et Pierre Ardizio.

(24 VI 48)

En raison de travaux poursuivis sur les irones et leurs dérivés, il nous a paru utile de multiplier les références relatives à l'absorption dans l'ultra-violet moyen de plusieurs dérivés des ionones, en particulier des semicarbazones et des phényl-4-semicarbazones.

L'absorption des semicarbazones d' α -ionone et de β -ionone a été étudiée par *Burawoy* sur les solutions alcooliques²⁾; nos observations sont un peu différentes:

Semicarbazones	$\lambda_{\text{max.}}$ (m μ)	log ϵ
α -Ionone, <i>Burawoy</i>	263,5	4,50
α -Ionone, ce travail	263,5	4,48
β -Ionone, <i>Burawoy</i>	276,5	4,367
β -Ionone, ce travail	283,0	4,336

¹⁾ LXVIIème communication: *Helv.* **31**, 1280 (1948).

²⁾ *Soc.* **1941**, 23.