

## RÉSUMÉ.

Une nouvelle méthode de dosage de l'activité  $\alpha$ -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 V<sup>1)</sup>.**

**Comparaison de l'action enzymatique d' $\alpha$ -amylases de diverses provenances**

par P. Bernfeld et Maria Fuld.

(22 VI 48)

Les  $\alpha$ -amylases de pancréas de porc<sup>2)</sup>, de salive humaine<sup>3)</sup> et de *Bacillus subtilis*<sup>4)</sup> 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 substratum<sup>5)</sup>. 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  $\alpha$ -amylases se manifeste: 1<sup>o</sup> par une rapide diminution de la viscosité d'un empois d'amidon, 2<sup>o</sup> par un changement de la coloration à l'iode d'une solution d'amylopectine, et 3<sup>o</sup> par une augmentation du pouvoir réducteur du substratum. L'augmentation du pouvoir réducteur mesure la scission des liaisons  $\alpha$ -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

<sup>1)</sup> IVme communication, *Helv.* **31**, 1420 (1948).

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

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

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

<sup>5)</sup> 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  $\alpha$ -amylase scinde de préférence des liaisons glucosidiques périphériques ou centrales.

Nous avons déterminé le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène pour les  $\alpha$ -amylases suivantes: 1<sup>o</sup>  $\alpha$ -amylase de pancréas de porc cristallisée, 2<sup>o</sup>  $\alpha$ -amylase de pancréas humain cristallisée<sup>1</sup>), 3<sup>o</sup>  $\alpha$ -amylase de salive humaine cristallisée, 4<sup>o</sup>  $\alpha$ -amylase de *Bacillus subtilis* cristallisée et 5<sup>o</sup>  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylatique sur l'amidon sont un mélange de dextrines possédant un degré de polymérisation moyen compris entre 3 et 6 restes de glucose. On sait que le degré de polymérisation moyen de ces dextrines varie selon l' $\alpha$ -amylase employée<sup>2</sup>). Ce phénomène doit être attribué à la différence d'affinité de chacune de ces  $\alpha$ -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' $\alpha$ -amylase.

La  $\beta$ -amylase hydrolyse uniquement les liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques voisines des groupes terminaux<sup>3</sup>). En effet, nous trouvons que le rapport: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène est six fois plus grand pour la  $\beta$ -amylase que pour l' $\alpha$ -amylase. Il est évident qu'une  $\alpha$ -amylase contenant de la  $\beta$ -amylase présentera un quotient plus élevé que l' $\alpha$ -amylase seule. La détermination de ce quotient sera donc très utile pour l'examen de la teneur, en  $\beta$ -amylase, d'une  $\alpha$ -amylase. Nous avons trouvé qu'on peut déceler avec certitude 5% de  $\beta$ -amylase (pourcentage des deux amylases exprimé par leur activité

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

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

<sup>3)</sup> 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*<sup>1)</sup>, beaucoup moins sensible, est applicable seulement si la constante de diffusion de l' $\alpha$ -amylase est plus petite que celle de la  $\beta$ -amylase.

### Partie expérimentale.

#### Solutions:

1<sup>o</sup> à 4<sup>o</sup>: voir solutions 1 à 4 de la communication précédente<sup>2)</sup>.

5<sup>o</sup> Solution alcaline d'acide dinitrosalicylique, voir <sup>3)</sup>, solution 2.

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

7<sup>o</sup> Substratum  $p_H$  6,9: 1,667 gr. d'amidon soluble *Zulkowski* et 78,0 mgr. de ClNa sont dissous dans environ 50 cm<sup>3</sup>; on ajoute 16,65 cm<sup>3</sup> de tampon de phosphate de  $p_H$  6,9 et de force ionique  $\mu = 0,60$ , puis on complète à 100 cm<sup>3</sup>.

#### Enzymes:

Des solutions aqueuses des  $\alpha$ -amylases cristallisées de pancréas de porc<sup>4)</sup>, de pancréas humain<sup>5)</sup>, de salive humaine<sup>6)</sup>, de *Bacillus subtilis*<sup>7)</sup> et d' $\alpha$ -amylase de malt purifiée<sup>8)</sup> ont été préparées, contenant chacune de 0,1 à 0,2 mgr. de protéine par cm<sup>3</sup>.

Une solution de  $\beta$ -amylase de patate cristallisée<sup>9)</sup> a été faite, contenant de 0,1 à 0,2 mgr. de protéine par cm<sup>3</sup>.

#### Détermination du pouvoir dextrinogène des $\alpha$ -amylases:

Ces essais ont été effectués dans les conditions décrites dans la communication précédente<sup>4)</sup> et avec les solutions 1 à 4.

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

#### Détermination du pouvoir saccharogène des $\alpha$ -amylases:

1 cm<sup>3</sup> de chacune des solutions d' $\alpha$ -amylase, possédant l'activité relative de 0,1, a été additionné à 20<sup>o</sup> de 1 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> d'eau et l'extinction déterminée au colorimètre photoélectrique de *Klett-Summerson*, en utilisant le filtre vert N<sup>o</sup> 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.

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

<sup>2)</sup> *Helv.* 31, 1420 (1948).

<sup>3)</sup> *Helv.* 31, 288 (1948).

<sup>4)</sup> *Helv.* 30, 64 (1947).

<sup>5)</sup> *Arch. Biochem.*, sous presse.

<sup>6)</sup> *Exper.* 3, 455 (1947).

<sup>7)</sup> *Exper.* 3, 411 (1947).

<sup>8)</sup> A publier.

<sup>9)</sup> *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  $\beta$ -amylase cristallisée.

Le pouvoir saccharogène des  $\alpha$ -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	pH	pouv. dextr. *)	pouv. sacch. **)	pouv. sacch. pouv. dextr.
$\alpha$ -amylase de pancréas de porc crist. . . .	6,9	0,1	0,98	9,8
$\alpha$ -amylase de pancréas humain crist. . . .	6,9	0,1	0,97	9,7
$\alpha$ -amylase de salive humaine crist. . . .	6,9	0,1	0,95	9,5
$\alpha$ -amylase de <i>Bac. subtilis</i> crist. . . . .	6,9	0,1	0,96	9,6
$\alpha$ -amylase de <i>Bac. subtilis</i> crist. . . . .	5,3	0,1	0,98	9,8
$\alpha$ -amylase de malt purifiée . . . . .	6,9	0,1	0,97	9,7
$\alpha$ -amylase de malt purifiée . . . . .	5,3	0,1	0,98	9,8
$\beta$ -amylase de patate crist. . . . .	5,3	0,012	0,73	61
$\alpha$ -amylase de malt purifiée contenant 5% de $\beta$ -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  $\beta$ -amylase:*

1 cm<sup>3</sup> de la solution de  $\beta$ -amylase cristallisée a été ajouté à 20° à 5 cm<sup>3</sup> de la solution de substratum 1. Après 180 secondes, 2 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> d'une solution 50 fois plus diluée (activité relative = 0,012) a été ajouté à 20° à 1 cm<sup>3</sup> de la solution de substratum 6. Après 180 secondes 2 cm<sup>3</sup> 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  $\beta$ -amylase sur le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène de l' $\alpha$ -amylase:*

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

a:  $\alpha$ -amylase de malt; 1 cm<sup>3</sup> de cette solution, diluée 1 à 10, donnait avec 1 cm<sup>3</sup> de la solution de substratum 6 en 3 minutes à 20° un pouvoir réducteur correspondant à 1,95 mgr. de maltose.

b:  $\beta$ -amylase de patate cristallisée; 1 cm<sup>3</sup> de cette solution, non diluée, donnait dans les mêmes conditions 0,96 mgr. de maltose.

Nous avons mélangé 2 cm<sup>3</sup> de la solution a avec 2 cm<sup>3</sup> 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' $\alpha$ -amylases de provenance différente sur l'amidon soluble, ont été mesurés et exprimés quantitative-ment. Le rapport de ces deux valeurs, c'est-à-dire le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène, est le même pour les  $\alpha$ -amylases cristallisées de pancréas de porc, de pancréas humain, de salive humaine, de *Bacillus subtilis* et pour l' $\alpha$ -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  $\beta$ -amylase dans une solution d' $\alpha$ -amylase.

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

---

190. Etudes sur les matières végétales volatiles LXVIII<sup>1</sup>).  
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' $\alpha$ -ionone et de  $\beta$ -ionone a été étudiée par *Burawoy* sur les solutions alcooliques<sup>2</sup>); nos observations sont un peu différentes:

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

<sup>1</sup>) LXVIIème communication: *Helv.* **31**, 1280 (1948).

<sup>2</sup>) *Soc.* **1941**, 23.