

Après 3 cristallisations successives, le degré de pureté des eaux-mères atteint celui des cristaux. L'électrophorèse à différents p_H et l'ultracentrifugation donnent des diagrammes d'une substance homogène. Les cristaux doivent donc être considérés comme de l' α -amylase de pancréas de porc pure.

L'enzyme ne contient ni phosphore, ni soufre, ni sucres réducteurs. Sa solubilité a été déterminée à différents p_H . L'enzyme pur est stable entre les p_H de 7 et 8,5, même à la dialyse. Son poids moléculaire est de 45 000. Sa mobilité électrophorétique à différents p_H et son spectre d'absorption dans l'ultra-violet, ont été déterminés.

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

241. Sur les enzymes amylolytiques IX¹⁾.

Stabilité et désactivation de l' α -amylase de pancréas de porc

par Ed. H. Fischer²⁾ et P. Bernfeld.

(3 IX 48)

La purification de l' α -amylase de pancréas de porc par Meyer, Fischer et Bernfeld³⁾ a conduit à l'obtention d'un enzyme ne contenant que de très petites quantités d'impuretés, d'après les analyses électrophorétiques. Les solutions de ce produit ainsi que celles des produits moins purifiés perdent assez rapidement leur activité amylatique, même à 0°. En dialysant l'enzyme, cette perte d'activité est fortement accélérée. Dans tous les cas, la désactivation est irréversible.

Par contre, ces auteurs ont constaté que l'adjonction d'une solution d'amylase bouillie et filtrée stabilise l'enzyme. En le dialysant contre ce jus bouilli, il ne subit aucune désactivation.

Ces faits ont amené ces auteurs à supposer que l' α -amylase contenait un coenzyme thermostable et dialysable. L'apoenzyme séparé du coenzyme par dissociation subirait une transformation irréversible. La dialyse ne ferait que déplacer l'équilibre de la dissociation.

Nous avons maintenant trouvé que l' α -amylase de pancréas de porc pure obtenue après plusieurs recristallisations est tout à fait stable⁴⁾. Conservées à 2°, ses solutions neutres ou faiblement alcalines

¹⁾ VIII^{me} communication, Helv. **31**, 1831 (1948).

²⁾ Boursier de la «Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie».

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

⁴⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Arch. Biochem. **14**, 149 (1947); Helv. **31**, 1831 (1948).

ne perdent pas leur activité amylatique pendant plus d'un mois. En outre, elles ne subissent aucune désactivation par dialyse prolongée contre une solution saline dans les mêmes conditions.

Puisque l' α -amylase pure est stable, on doit admettre que la désactivation de l'enzyme est provoquée par une substance contenue dans les impuretés. En effet, nous avons constaté qu'une solution d' α -amylase de pancréas de porc contenant encore environ 3 à 5% d'impuretés —, et ayant complètement perdu son activité enzymatique — est capable de désactiver une solution d' α -amylase pure qui, seule, serait parfaitement stable. De très faibles quantités d'impuretés sont déjà suffisantes pour que l'enzyme se désactive. Il est rare qu'une seule cristallisation puisse les éliminer.

Le désactivateur est non dialysable. En solution, il est détruit par une courte ébullition ou par un traitement à l'acide trichloracétique. Il est donc probablement de nature protéique.

Afin de mieux connaître la nature de la désactivation de l' α -amylase de pancréas de porc, nous avons étudié les produits qui en résultent. Nous avons dialysé à froid une préparation d'amylase partiellement purifiée (stade II). Après 5 jours, environ 98% de l'activité initiale avait disparu et 50% de l'azote protéique avait passé à travers la membrane sous forme d'acides aminés ou de polypeptides à poids moléculaire bas. Nous avons alors précipité toutes les substances non dialysables par l'acétone et redissous le précipité dans le minimum d'eau. Cette solution fournit après quelques jours une quantité abondante de cristaux (fig. 1). Ils sont peu solubles à p_H 8,5, possèdent

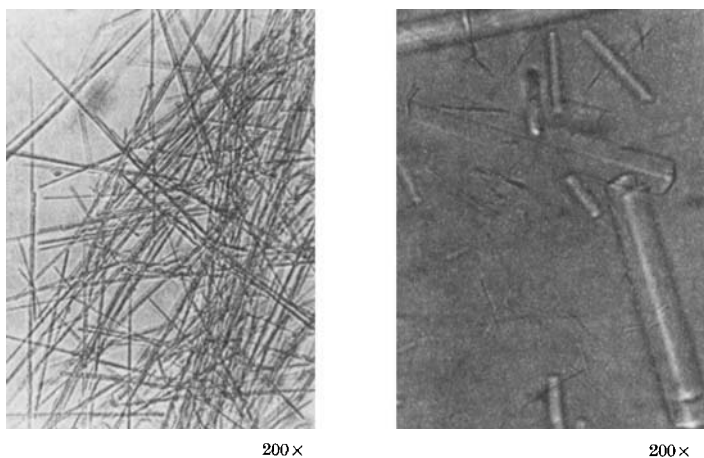


Fig. 1.

Produits de dégradation de l' α -amylase de pancréas de porc.

toutes les propriétés des protéines, sont dépourvus de toute activité amylatique et représentent ensemble environ 30 à 50% du poids de

l'amyrase de départ. Ce produit s'est donc formé à partir de l'amyrase active.

En prolongeant la dialyse ou en l'effectuant à température plus élevée, la partie non dialysable fournit également un mélange de cristaux, mais ce produit est bien différent d'aspect et de comportement du précédent. Il se présente sous forme d'un amas de très petites aiguilles, excessivement solubles à p_H 8,5. L'électrophorèse montre le diagramme d'une substance inhomogène à deux composantes principales. Leur vitesse de migration et leur constante de diffusion sont plus élevées que celles correspondant à l' α -amyrase ou au produit de la fig. 1. Leur poids moléculaire en est donc inférieur.

En conséquence, la désactivation de l' α -amyrase de pancréas de porc est accompagnée d'une scission progressive de la protéine en substances de poids moléculaire inférieur. Il nous semble très probable que cette dégradation soit due à l'action d'un ou de plusieurs enzymes protéolytiques accompagnant l' α -amyrase comme impureté. La trypsine ne peut être mise en cause, n'ayant aucune action sur l'amyrase¹).

Alors que la désactivation de l' α -amyrase est toujours irréversible, nous avons pu la ralentir, voire la supprimer, par adjonction d'une solution d'amyrase impure (stade II), bouillie et filtrée²). Pourtant, aucune réactivation par ce jus bouilli n'a pu être observée. Celui-ci ne contient donc pas un activateur, mais bien un stabilisateur. L'action de ce stabilisateur est antagoniste à l'action désactivante des solutions d'amyrase impure. Il est thermostable, dialysable, et possède donc un poids moléculaire bas.

Afin de purifier la substance stabilisatrice, nous l'avons séparée des protéines par plusieurs méthodes: coagulation de ces dernières à l'ébullition, ultrafiltration, dialyse ou adsorption du stabilisateur sur un échangeur anionique. Nous avons ainsi obtenu un mélange d'acides aminés, de peptides à poids moléculaire bas, de phosphate minéral et d'esters phosphoriques. De ce mélange, on élimine d'abord la tyrosine qui se sépare à froid, puis on précipite le phosphate minéral par l'acétate d'argent. Finalement, par précipitations fractionnées à l'acétone, on obtient les composés phosphorylés organiques sous forme de leurs sels d'argent. Le stabilisateur précipite dans la fraction entre 50 et 70 % d'acétone. Cette fraction contient entre autres un diester phosphorique, dont un des groupes est labile à l'hydrolyse alcaline, mais résiste à l'hydrolyse acide, alors que l'autre résiste à la soude, mais est scindé par l'acide (fig. 2). Il pourrait s'agir d'une substance dans laquelle l'acide phosphorique serait lié à la fois à un acide aminé

¹) Helv. **31**, 1831 (1948).

²) K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper. **2**, 362 (1946); Helv. **30**, 64 (1947).

et à un polyalcool non réducteur, par exemple l'inositol. L'inositol a en effet été trouvé dans l' α -amylase de pancréas par *Williams* et collaborateurs¹⁾. Il n'est pourtant pas encore établi que le stabilisateur soit identique à ce diester phosphorique. Ni l'inositol seul, ni la phytine n'exercent cette action stabilisatrice.

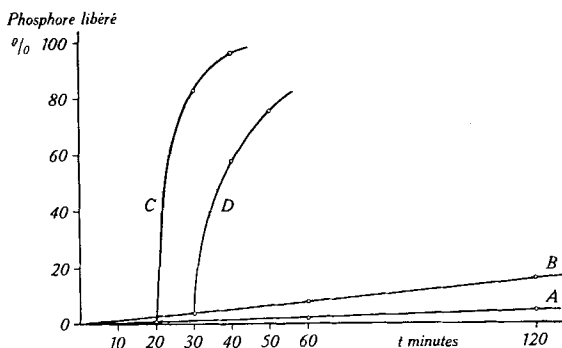


Fig. 2.

Hydrolyse à 100° du diester phosphorique.

Courbe A: par ClH n.

Courbe B: par NaOH n.

Courbe C: par NaOH n., après traitement de 20 minutes par ClH n.

Courbe D: par ClH n., après traitement de 20 minutes par NaOH n.

Les phénomènes de la désactivation et de la stabilisation de l'amylase de pancréas de porc qui, au début, étaient difficiles à interpréter, ont ainsi trouvé une explication simple. L'enzyme brut est accompagné d'une protéase spécifique qui le dégrade, entraînant simultanément sa désactivation. Cette dégradation protéolytique est inhibée par une substance à poids moléculaire bas également présente dans les solutions brutes d'amylase. En augmentant la concentration de cette substance à poids moléculaire bas, l'amylase est stabilisée; en l'éliminant, par exemple par dialyse, la désactivation est accélérée. L'action de la protéase et celle du stabilisateur sont donc antagonistes. Nous ne pouvons pas encore dire si ce stabilisateur inhibe spécifiquement la protéase ou s'il possède une action protectrice, spécifique, sur l'amylase. Aucun coenzyme n'intervient, à notre connaissance, dans ces phénomènes de désactivation et de stabilisation.

Partie expérimentale.

Préparation des produits résultant de la désactivation de l' α -amylase.

400 cm³ de l'enzyme (stade II)²⁾ sont traités huit fois de suite selon *Sevag* (voir stade VI). La liqueur limpide jaune-clair (environ 370 cm³) est portée à pH 8,5 par NH₄OH

¹⁾ R. J. Williams, F. Schlenk et M. A. Eppright, Am. Soc. **66**, 896 (1944).

²⁾ Helv. **31**, 1831 (1948).

n. et additionnée de 3 cm³ de toluène, puis dialysée à 3° contre un litre d'eau distillée contenant 5 cm³ de NH₄OH n.

La dialyse s'opère en tube de « cellophane » de la *Visking Corporation* (Chicago) de 3,5 cm³ de diamètre, traité préalablement pendant 5 minutes par de l'eau bouillante. Le tube est solidement fermé aux deux extrémités après avoir été entièrement rempli par la solution. Il n'y a donc pas d'air à la surface de la solution de protéine. Le tube est fixé par l'une de ses extrémités à l'axe d'une poulie. Il est entièrement plongé dans l'eau et tourne lentement sur lui-même. Ce mouvement rotatoire agit les solutions tant intérieure qu'extérieure. La solution externe est renouvelée deux fois par jour par un litre d'eau distillée contenant 5 cm³ NH₄OH n. Après 6 jours, on transvase la solution limpide intérieure (env. 380 cm³, p_H 8,5) dans un becher et ajoute 950 cm³ d'acétone. On dissout le culot obtenu après centrifugation dans le minimum d'eau (env. 10 cm³). 48 heures après, cette solution sursaturée fournit une quantité considérable de cristaux.

Purification partielle de la substance stabilisatrice.

Les liqueurs extérieures de la dialyse, gardées à froid sous toluène, sont réunies (env. 12 litres), puis concentrées au vide jusqu'à un volume de 80 cm³ (p_H final = 7). Après un repos de 48 heures à 2°, on filtre la tyrosine qui s'est déposée sous forme cristalline, et lave le filtre jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus de phosphate. On réunit les eaux de lavage au filtrat et concentre au vide à 50 cm³. Cette liqueur contient environ 0,4 mgr. de P par cm³, dont un tiers comme phosphate minéral, dosé selon *King*¹⁾. On ajoute 10 cm³ d'une solution fraîche d'acétate d'argent à 1%, filtre, puis fractionne par l'acétone les sels d'argent des esters phosphoriques présents dans la solution. Entre 40 et 50% d'acétone, il se forme un précipité constitué par un phosphate d'argent estérifié. Celui-ci est soluble en milieu acide (p_H 4), mais précipite en milieu neutre ou alcalin. Il est transformé en sel sodique par un excès de ClNa et ne possède aucune action stabilisatrice. En poursuivant le fractionnement jusqu'à 70% d'acétone, la solution devient très trouble par formation d'une émulsion. Après 48 heures, on centrifuge et obtient une huile jaune et dense. Elle contient entre autres un phosphate d'argent diestérifié. Il est exempt de phosphate minéral. Après addition de ClNa en excès et filtration, on obtient la solution des sels sodiques correspondants possédant une action stabilisatrice.

La figure 2 montre la libération de phosphate minéral à partir du diester phosphorique par ébullition avec ClH n., par ébullition avec NaOH n. et par ébullition alternative avec ClH n. et NaOH n.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. le Professeur *Kurt H. Meyer* pour ses conseils et l'intérêt qu'il a témoigné à ces travaux.

L'un de nous (*E. H. F.*) remercie très vivement le comité de la *Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie* de l'appui généreux qu'il lui a donné.

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

RÉSUMÉ.

L' α -amylase de pancréas de porc pure est stable.

A l'état impur, l'amylase est accompagnée d'un enzyme protéolytique qui la désactive par scission hydrolytique. Une seule cristallisation de l'amylase n'est pas suffisante pour la débarrasser de cette impureté. La désactivation est toujours irréversible. Quelques

¹⁾ *E. J. King*, *Bioch. J.* **26**, 292 (1932).

substances résultant de la dégradation protéolytique de l' α -amylase ont été obtenues à l'état cristallin.

L' α -amylase de pancréas de porc impure contient en outre une substance stabilisatrice. Celle-ci est thermostable et dialysable. Elle n'est pas nécessaire à l'activité amylatique, mais son action est antagoniste à la désactivation provoquée par l'enzyme protéolytique. Cette substance stabilisatrice a été enrichie.

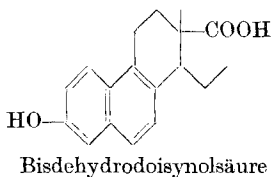
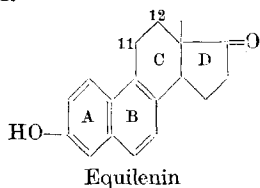
Laboratoires de Chimie organique et inorganique
de l'Université de Genève.

242. Abkömmlinge alkylierter β -Naphtyl-valeriansäuren. Über oestrogene Carbonsäuren XXVI¹⁾

von P. Wieland und K. Miescher.

(3. IX. 48.)

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Monocarbon-säuren vom Typus der Doisy-nolsäuren, welche sich vom Equilenin oder Oestron durch Öffnung des Ringes D ableiten, teilweise eine grössere oestrogene Wirksamkeit an der Ratte besitzen als das wirksamste in der Natur aufgefundene weibliche Hormon, das Oestradiol.



Kürzlich wurde nun von Horeau und Jacques²⁾ eine Verbindung der Konstitution XIIa beschrieben, welcher nach Versuchen von E. Tschopp im Oestrustest an der Ratte noch 1/7 der Aktivität der racemischen Bisdehydrodoisy-nolsäure zukommt³⁾. Sie wurde von ihnen als α, α -Dimethyl- β -äthyl-allenolsäure bezeichnet⁴⁾ und unterscheidet sich von der Bisdehydrodoisy-nolsäure dadurch, dass Ring C geöffnet ist und überdies die CH_2 -Gruppe in 11-Stellung fehlt. Da Oestron das Naphtalinderivat Equilenin um etwa das 30—40-fache

¹⁾ XXV, siehe J. R. Billeter und K. Miescher, *Helv.* **31**, 1302 (1948).

²⁾ A. Horeau und J. Jacques, *C. r.* **224**, 862 (1947).

³⁾ K. Miescher, Vortrag New York (Sept. 1947), London (Juli 1947).

⁴⁾ R. Courrier, A. Horeau und J. Jacques, *C. r.* **224**, 1401 (1947).