

En acidulant les eaux mères et les eaux de lavage avec de l'acide chlorhydrique, on obtient 2 à 3 g d'acide benzoïque (F. 119—120° non corr.).

Le produit brut jaunâtre ne présente pas de F. net, mais coule vers 136—142°; on le pulvérise et le cristallise dans du benzène (solubilité à l'ébullition: environ 10%), la masse cristalline obtenue fond alors à 165—166° (corr.); le F. ne s'élève pas par nouvelle cristallisation dans le benzène; par cristallisation une nouvelle fois dans l'alcool absolu, on obtient de fines aiguilles blanches F. 167—168° (corr.).

$C_{15}H_{13}O_2N_3$ Calculé N 15,72% Trouvé (Kjeldahl) N 15,95; 15,87%

RÉSUMÉ.

Traitée par le chlorure de benzoyle en milieu fortement alcalin, la guanidine fournit la dibenzoylguanidine.

Laboratoires Om S.A., Genève.

239. Purification et cristallisation de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

Sur les enzymes amylolytiques XVIII¹⁾)

par Ed. H. Fischer et R. de Montmollin.

(14 VIII 51)

La comparaison des propriétés²⁾ des α -amylases cristallisées de malt³⁾, de bactérie⁴⁾, de pancréas de porc⁵⁾, de salive⁶⁾ et de pancréas⁷⁾ humains a montré qu'elles varient régulièrement lorsqu'on passe du règne végétal au règne animal, ce qui souligne l'étroite parenté pouvant exister entre des protéines de même activité biologique.

Comme c'est souvent le cas pour des enzymes bactériens, l' α -amylase de *B. subtilis* semble plutôt apparentée aux amylases animales. Comme celles-ci, et sous certaines conditions, elle peut être activée par l'ion chlore, mais non par l'ion Ca^{++} indispensable à l' α -amylase de malt⁸⁾.

¹⁾ Préc. Comm., *Helv.* **34**, 325 (1951).

²⁾ K. H. Meyer, *Angew. Chem.* **63**, 153 (1951).

³⁾ S. Schwimmer & A. K. Balls, *J. Biol. Chem.* **176**, 465 (1947), **179**, 1063 (1949); *Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, Helv.* **34**, 325 (1951).

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

⁵⁾ K. H. Meyer, *Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv.* **30**, 64 (1947); *Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv.* **31**, 1831 (1948).

⁶⁾ K. H. Meyer, *Ed. H. Fischer, A. Staub & P. Bernfeld, Helv.* **31**, 2158 (1948); *P. Bernfeld, A. Staub & Ed. H. Fischer, Helv.* **31**, 2165 (1948).

⁷⁾ K. H. Meyer, *Ed. H. Fischer, P. Bernfeld & F. Duckert, Arch. Biochem.* **18**, 203 (1948); *Ed. H. Fischer, F. Duckert & P. Bernfeld, Helv.* **33**, 1060 (1950); *P. Bernfeld, F. Duckert & Ed. H. Fischer, Helv.* **34**, 1064 (1950).

⁸⁾ S. Schwimmer & A. K. Balls, *J. Biol. Chem.* **179**, 1063 (1949).

Afin de compléter nos connaissances sur les variations présentées par les amylases de différentes origines, il nous a semblé intéressant d'étudier les propriétés d'un enzyme pur, qui, d'un point de vue systématique, trouverait sa place entre l'amylase de malt (orge germée) et l'amylase de bactérie. A cet effet, nous nous sommes adressés à un champignon inférieur, et le présent travail décrit la purification et la cristallisation de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, connue sous le nom de Taka-diastase.

Connu depuis plus de 2000 ans au Japon sous le nom de Koji¹⁾, l'*Aspergillus oryzae* y était utilisé pour la fabrication du «saké», sorte de bière de riz. *Atkinson*²⁾ en 1881, puis *Kellner, Mori* et *Nagoaka*³⁾ en 1890, décrivent certaines propriétés du Koji et observent notamment qu'il invertit le sucre de canne, dégrade l'amidon en maltose et en «dextrose» et scinde enfin le maltose et le «dextrose» en glucose. En 1898, *Jokichi Takamine*⁴⁾ attribue le pouvoir amylolytique de l'*Aspergillus oryzae* à l'action d'une «diastase» qu'il appelle «Taka-diastase». La Taka-diastase est devenue dès lors un produit commercial⁵⁾ qui joue actuellement un rôle considérable dans l'industrie des textiles et dans celle de l'alimentation.

De nombreuses tentatives de purification de la Taka-diastase ont été décrites: adsorptions sélectives sur du kaolin⁶⁾, sur de l'oxyde d'aluminium⁷⁾, extraction fractionnée par le NaCl⁸⁾, précipitation par la lignine ou le tannin⁹⁾, par l'alcool¹⁰⁾, ou le sulfate d'ammonium¹¹⁾. Mais aucune de ces purifications n'a permis l'obtention d'un produit pur¹²⁾.

Nous avons systématiquement réexaminé ces différentes méthodes et constaté que, même en les modifiant, il n'était pas possible de réaliser la purification totale de l'enzyme. Ce n'est qu'après avoir introduit un nouveau procédé — précipitation fractionnée du produit sous une force ionique élevée, par le mélange de deux sels — que nous avons finalement pu le cristalliser.

¹⁾ *Y. Kozaï*, C. für Bakteriologie II, **12**, 248 (1900).

²⁾ *R. W. Atkinson*, Proc. Roy. Soc. **32**, 299 (1881).

³⁾ *O. Kellner, Y. Mori & M. Nagoaka*, Z. f. physiol. Chem. **14**, 275 (1890).

⁴⁾ *J. Takamine*, J. Soc. Chem. Ind. **17**, 118 (1898).

⁵⁾ *J. Takamine*, J. Ind. Eng. Chem. **6**, 824 (1914); J. agr. Chem. Soc. Jap. **13**, 35 (1937).

⁶⁾ *F. Hemmi & G. Inami*, Bull. agr. Chem. Soc. Jap. **5**, 54 (1929), réf. C. **1930** II, 2393.

⁷⁾ *S. Nishimura*, Bull. agr. Chem. Soc. Jap. **2**, 129 (1926); *K. Toshio*, J. Soc. Chem. Ind. Jap. (Suppl.) **39**, 22B, 163B (1936).

⁸⁾ *Y. Tokuoka*, J. Soc. Chem. Ind. Jap. **12**, 1185, 1202 (1936); J. agr. Chem. Soc. Jap. **15**, 735 (1937).

⁹⁾ *J. S. Wallerstein, R. T. Alba & M. G. Hale*, Arch. Biochem. **7**, 357, 365 (1945); **8**, 275 (1945).

¹⁰⁾ *H. C. Shermann & A. P. Tannberg*, Am. Soc. **38**, 1638 (1916); *K. Toshio*, J. Soc. Chem. Ind. Jap. (Suppl.) **38**, 447B (1936).

¹¹⁾ *M. L. Caldwell, R. M. Chester, A. H. Doebbeling & G. Volz*, J. Biol. Chem. **161**, 361 (1945).

¹²⁾ Signalons que *L. A. Underkofer & D. K. Roy* ont annoncé dernièrement la cristallisation d'une α -amylase à partir du filtrat de culture d'*aspergillus oryzae*. (Cereal Chem. **28**, 18 (1951)).

Dosage de l' α -amylase. L'activité α -amylatique est dosée d'après la méthode colorimétrique à l'acide dinitro-3,5-salicylique¹⁾.

L'unité d' α -amylase (activité = A) est la quantité d'enzyme qui libère 1 mg de maltose en 3 min. à 20° C, pH 5,7, à partir d'une solution d'amidon selon Zulkowski²⁾). Lors des dosages, la quantité d'enzyme doit être telle que la dégradation du substrat ne dépasse pas 15%. Le degré de pureté est exprimé par le rapport de l'activité par mg d'azote Kjeldahl (A/mg N). Les enrichissements sont rapportés aux valeurs trouvées dans la suspension initiale de la poudre sèche.

Le contrôle de l'absence de la β -amylase a été effectué par la mesure du pouvoir saccharogène sur le pouvoir dextrinogène (PS/PD)³⁾. Ce rapport est de 61 pour les β -amylases de patates douces et de malt cristallisées⁴⁾ et de 9,7 pour les α -amylases pures. Il ne permet pourtant pas de déceler moins de 5% de β -amylase en présence d' α -amylase.

L'absence de maltase est contrôlée en faisant agir la solution d'enzyme sur une solution de maltose à 1% à pH 4,7 puis en dosant le glucose éventuellement libéré d'après la méthode colorimétrique de Benham & Petzing⁵⁾.

Produit de départ. Au début de ce travail, différents produits gracieusement mis à notre disposition par les *Takamine Laboratories Inc.*⁶⁾ avaient été examinés: «Crude Taka», «Clarase», «Rhozyme», «Mylase» et «Hydrolase». La «Crude Taka» nous a servi pour nos premiers essais, montrant le maximum d'activité amylatique. Nous l'avons ensuite remplacée par un nouveau matériel, la «Clarase 900 concentrated». Quoique fortement enrichie en α -amylase, la «Clarase 900» contient pourtant entre autres de la β -amylase, de la maltase et de fortes quantités de lactose qui gênent les dosages d'activité. Elle est parfaitement stable, conservée à froid à l'abri de l'humidité.

Purification. L'enzyme est extrait en suspendant la poudre sèche dans 6 fois son poids d'eau et en maintenant pendant 12 h. cette suspension à froid, sous agitation. Après centrifugation, on élimine la majorité des hydrates de carbone par une précipitation de l'extrait brut au sulfate d'ammonium solide. Le culot est dissous et la solution fractionnée par l'acétone à pH 6,0.

Le produit obtenu a un degré de pureté d'environ 1200 A/mg N et se trouve donc à 50% de pureté. Pourtant examiné à l'électropho-

¹⁾ G. Noelting & P. Bernfeld, *Helv.* **31**, 286 (1948).

²⁾ Les activités enzymatiques indiquées ne représentent aucunement des valeurs absolues, car elles varient selon le substrat utilisé. Avec de l'amidon soluble *Merck* d'après Zulkowski (produit plus dégradé que le nôtre), on obtient par exemple des valeurs près de 2 fois plus élevées.

³⁾ P. Bernfeld & M. Fuld, *Helv.* **31**, 420 (1948).

⁴⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & A. Piguet, *Helv.* **34**, 316 (1951).

⁵⁾ G. H. Benham & V. E. Petzing, *Anal. Chem.* **21**, 991 (1949).

⁶⁾ Clifton, New Jersey (USA.).

rèse à différents pH, il montre un composant principal E représentant plus de 90 % de la totalité des produits en jeu.

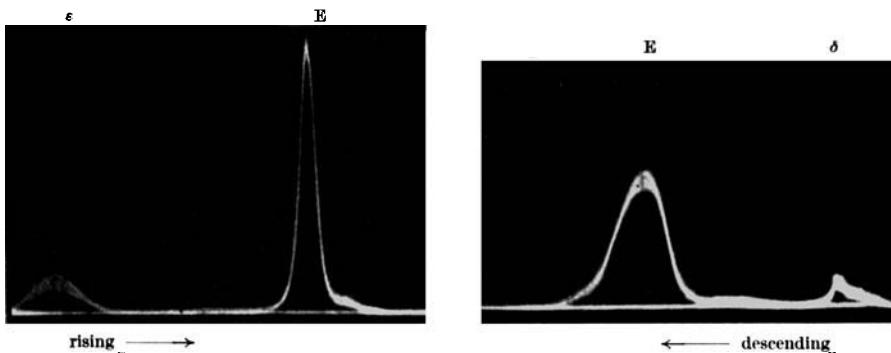


Fig. 1.

Diagramme électrophorétique (Philpot-Svensson).

Tampon de *Michaelis*, pH 8,6; $\mu = 0,1$.

Température 4,0°. Durée: 151 min. à 0,206 V/cm.

Un fait semblable a déjà été constaté par l'un de nous lors de la purification de l' α -amylase de pancréas de porc. En effet, cet enzyme pouvait subir une brusque dénaturation lors de sa purification, en donnant un précipité inactif qui, une fois remis en solution en milieu alcalin, présentait des propriétés physiques et chimiques très voisines de l'enzyme natif. Il se comportait, à l'électrophorèse, comme une substance homogène.

Nous croyons avoir à faire ici à un phénomène semblable et supposons que notre solution impure d' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* contient une quantité notable d'amylase désactivée qu'il n'est pas possible de distinguer de l'enzyme actif par électrophorèse. Cette hypothèse semble confirmée par le fait qu'il ne nous a pas été possible d'enrichir cette solution d'enzyme ni par des précipitations fractionnées, soit au sulfate d'ammonium (SA), soit au sulfate de cadmium, ni par des précipitations acétoniques à différentes concentrations en sels, ceci à tous les pH entre 3 et 8,5. L'enzyme étant très soluble, on ne peut le précipiter par d'autres sels. Des précipitations par l'acide picrique n'amènent aucun enrichissement de l'enzyme. Il est dénaturé par traitements au mélange chloroforme-alcool amylique. Enfin des essais d'adsorptions sélectives de l'enzyme sur de l'amidon de maïs selon *Schwimmer & Balls*¹), en solution aqueuse ou acétonique, sont restés sans résultats.

Par contre ce produit a pu être purifié par des précipitations fractionnées successives sur des solutions portées préalablement à 0,75 sat. en NaCl. En élevant ainsi considérablement la force ionique de la

¹) *S. Schwimmer & A. K. Balls*, J. Biol. Chem. **179**, 1063 (1949).

solution, les premiers précipités qui se forment par addition de SA entraînent la majeure partie des impuretés. La solution purifiée qu'on obtient est passablement moins colorée et possède un degré de pureté de 1950 A/mg N. Elle a pu être cristallisée.

Le tableau I rapporte les rendements et enrichissements obtenus à chaque stade de la purification.

Tableau I.

Stade	Opération	Rendement par rapport à la susp. initiale	Degré de pureté A/mg N	Enrichissement par rapport à la susp. brute
I	Suspension initiale		625	
	Sol. après centrifugation	90%	915	1,46
II	SA 0,8 sat.	68%	1100	1,76
III	Acétone 40—58%	52%	1200	1,92
IV	NaCl + SA 0,54—0,72 sat.	41%	1630	2,6
V	NaCl + SA 0,41—0,71 sat.	25%	1950	3,1

Cristallisation et recristallisation de l'enzyme. Une solution contenant env. 7 % de protéines, ajustée à pH 7,2 est laissée à froid, à pression ordinaire, en présence de silicagel. La cristallisation commence après 24 h. env. et après 48 h., 70 à 80 % de l'activité se trouvent dans le matériel cristallin. Les cristaux sont lavés 3 fois de suite avec une solution demi-saturée en SA, et le culot obtenu après la dernière centrifugation, redissous dans le minimum d'eau, est recristallisé comme décrit ci-dessus.

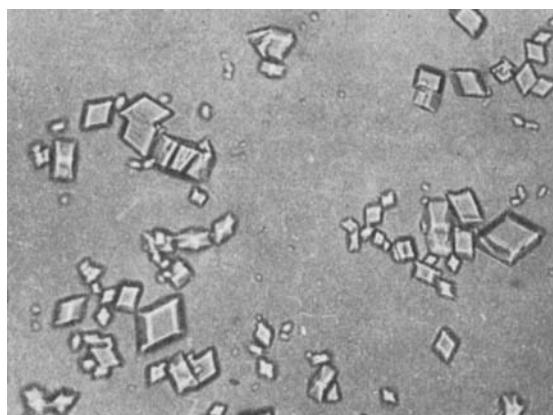


Fig. 2.
Cristaux d' α amylase d'*Aspergillus oryzae*.
(Grossissement 250 \times)

Après 3 cristallisations successives, le degré de pureté des eaux mères atteint pratiquement celui des cristaux, confirmant que le produit cristallisé est bien l' α -amylase.

Tableau II.

Opération	% d'enzyme cristallisé	Degré de pureté A/mg N	
		Cristaux	Eaux mères
1re cristallisation	70	2340	1600
1re recristallisation	73	2390	2220
2e recristallisation	80	2400	2390

Electrophorèse. Le produit cristallisé ne donne qu'un seul composant à l'électrophorèse, examiné entre pH 4,6 et 8,7 (fig. 3). Mais d'après ce qui a été dit plus haut, cette méthode d'analyse ne peut servir de preuve à la pureté de notre enzyme.

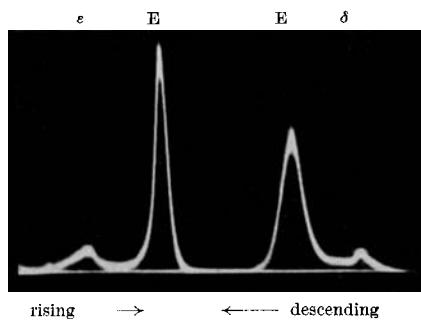


Fig. 3.

Diagramme électrophorétique (*Philpot-Svenson*).

Tampon de *Michaelis*, pH 4,6; $\mu = 0,1$.

Température 4,0°. Durée: 120 min. à 0,176 V/cm.

Absence de maltase et de β -amylase. L'enzyme cristallisé est dépourvu de toute action maltasique. Laissé 12 heures à 20° en contact avec une solution de maltose à 1%, pH 4,7, nous n'avons pu constater aucune augmentation du pouvoir réducteur.

Nous avons comparé le rapport du pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène de notre amylase pure avec celui de l' α -amylase de salive cristallisée. Ce rapport étant le même pour les deux enzymes, nous en avons conclu que notre produit est dépourvu de β -amylase. Enfin aucun autre enzyme agissant sur l'amidon n'a pu être décelé.

Partie expérimentale.

*Purification de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*.*

Eau: distillée sur BaO avec réfrigérant en étain.

Acétone: redistillée sur permanganate et carbonate de sodium, 98%. Sauf indication spéciale, toutes les opérations s'effectuent au dessous de 5°, sauf les fractionnements au sulfate d'ammonium (SA) en présence de NaCl qui ont lieu entre 15 et 20°. Les *précipi-*

tations fractionnées se font dans un bain de glace fondante et sous bonne agitation; celle-ci est continuée pendant au moins 10 min. après adjonction de l'agent précipitant.

Les *centrifugations* se font à 3000 t/min. à 0° sauf indication spéciale.

Produit de départ: «Clarase 900 concentrated»¹⁾. C'est une poudre beige clair contenant environ 20% d'humidité, 20 à 30% de cendres et passablement de lactose. Activité ($\alpha + \beta$ -amylatique) 1800 mg maltose/g; sucres réducteurs (évalués en maltose) 405 mg/g; azote (*Kjeldahl*) 28,85 mg/g; A/mg N = 625.

60 g de clarase sont suspendus dans 360 cm³ d'eau distillée et laissés à froid sous faible agitation pendant 12 h.; le pH s'établit entre 6,0 et 6,3.

Stade I: La suspension brute est centrifugée 15 min. Le culot est rejeté et la solution brun-noir surnageante est portée à 400 cm³. Activité ($\alpha + \beta$ -amylatique) 3000 à 4000 mg maltose/cm³; A total env. 1400000; N 3,5 à 4,5 mg/cm³.

Stade II: A la solution précédente contenant environ 2,5% de protéines, on ajoute d'un seul coup 225 g de SA (0,8 sat)²⁾. On agite pendant 3 h. puis filtre sur Filter Cel. Le précipité est lavé 3 fois de suite par env. 150 cm³ d'une solution de SAS (SA saturé) à pH 6,0. Le culot est repris par de l'eau distillée, on élimine le Filter-Cel par filtration et porte le filtrat à 200 cm³ en ajustant le pH à 6,0 par quelques gouttes d'ammoniaque. Activité 4500 mg maltose/cm³; N 4,05 mg/cm³; protéines 2,5%; sucres réducteurs totaux après hydrolyse: moins de 1%.

Stade III: 200 cm³ de la solution précédente sont additionnés de 140 cm³ d'acétone (40%), puis centrifugés 10 min. Le culot est rejeté et l'on rajoute à la liqueur 200 cm³ d'eau distillée afin de diminuer la concentration des protéines et celle du SA provenant du fractionnement précédent. On ajoute alors 400 cm³ d'acétone (58%) puis centrifuge pendant 10 min. La solution surnageante est rejetée et le culot dissous dans 100 cm³ d'une solution 0,75 sat. en NaCl, pH 7,2. Activité 6800 mg maltose/cm³; N 5,7 mg/cm³.

Stade IV: La solution du stade III est additionnée à température ordinaire de 120 cm³ d'une solution de SAS, pH 7,2 (0,54 sat.). Le pH baisse au cours de l'opération et on le maintient à 7,2 par quelques gouttes d'ammoniaque 2-n. On agite encore 20 min. et centrifuge 20 min. à 20000 t/min.³⁾ à température ordinaire. Le culot brun foncé est rejeté. La solution surnageante (env. 200 cm³) est précipitée à froid par 1 volume d'une solution de SAS (0,72 sat.) puis centrifugée à froid pendant 20 min. à 20000 t/min. Le culot est dissous dans 85 cm³ d'eau distillée auxquels on ajoute 1 volume d'une solution saturée en NaCl. On ajuste le pH à 7,2. Activité 3430 mg maltose/cm³; N 2,11 mg/cm³.

Stade V: Les 170 cm³ de la solution précédente (demi-saturée en NaCl) sont fractionnées comme indiqué au stade IV, mais cette fois entre 0,41 et 0,71 sat. en SA. Le précipité obtenu à 0,71 sat. est centrifugé 15 min. à 40000 t/min.

Cristallisation et recristallisation. Le culot extrêmement tassé qu'on obtient à la dernière centrifugation est dissous dans le minimum d'eau et cette solution, contenant env. 7% de protéines, est ajustée à pH 7,2 par quelques gouttes d'ammoniaque 2-n. Elle est concentrée sur silicagel, à froid et à pression ordinaire. Après 24 h., env. 70 à 80% de l'activité se trouvent dans le matériel cristallin. Les cristaux sont alors centrifugés, lavés 3 fois de suite par une solution demi-saturée en SA de pH 7,2, et le culot obtenu par une dernière centrifugation à 40000 t/min. est redissous dans le minimum d'eau. Cette solution est recristallisée comme décrit ci-dessus.

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

Nous remercions aussi le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* ainsi que la *Rockefeller Foundation* pour l'aide qu'ils nous ont accordée.

¹⁾ *Takamine Lab. Inc.*, Clifton, N. J., USA.

²⁾ Les chiffres entre parenthèses indiquent les teneurs finales en agents précipitants.

³⁾ «*Spinco Model L preparative Ultracentrifuge*» Belmont, Calif., (USA.).

RÉSUMÉ.

La purification et la cristallisation de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* à partir d'une poudre sèche sont décrites. Après un enrichissement d'environ 4 fois, l'on obtient, à partir de 60 g de produit brut, 800 mg d'enzyme cristallisé. Après trois recristallisations successives, le degré de pureté des eaux-mères atteint pratiquement celui du produit cristallisé. L'électrophorèse à différents pH montre qu'il s'agit d'une substance parfaitement homogène. Les cristaux doivent donc être considérés comme de l' α -amylase pure d'*Aspergillus oryzae*.

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

**240. Propriétés de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* cristallisée.
Sur les enzymes amylolytiques XIX¹⁾**

par Ed. H. Fischer et R. de Montmollin.

(14 VIII 51)

Dans la communication précédente nous décrivons la purification et la cristallisation de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*. Nous rapportons ici les propriétés de l'enzyme cristallisé, qui sont, en fin de ce travail, comparées à celles des autres α -amylases obtenues à l'état pur.

Nature protéique. L' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (A.O.) pure présente les réactions typiques des protéines. Elle réagit au biuret et à la ninhydrine. Elle est coagulée à chaud et est irréversiblement dénaturée par l'acide trichloracétique. Elle contient 12,9 % d'azote et moins de 0,03 % de phosphore.

Activité en fonction du pH. L'enzyme est actif entre pH 3,5 et 7,0 avec un palier correspondant à l'optimum d'activité entre pH 5,5 et 5,9 (Fig. 1).

Stabilité en fonction du pH. Les solutions d' α -amylase d'A.O. sont un peu moins stables que celles de malt et de *B. subtilis*. À 20°, elles perdent assez rapidement leur activité au-dessous de pH 5,5 et au-dessus de 8,5. À 0° et à pH 7, par contre, les solutions sont parfaitement stables (fig. 2).

Solubilité. La solubilité de l'enzyme est très forte dans l'eau, à pH 7 (env. 10%). Elle se rapproche donc de celle de l' α -amylase de malt²⁾.

¹⁾ Précédente comm., *Helv.* **34**, 1987 (1951).

²⁾ Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, *Helv.* **34**, 325 (1951).