

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).

Mobilité électrophorétique. La mobilité électrophorétique de l'enzyme a pu être déterminée dans la zone de pH n'entraînant pas sa désactivation trop rapide, c'est-à-dire entre 4,6 et 8,7. Elle passe de 4 à $7 \cdot 10^{-5}$ cm² volt⁻¹ sec.⁻¹ entre ces deux pH.

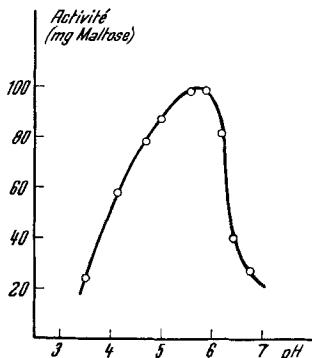


Fig. 1.

Activité en fonction du pH.

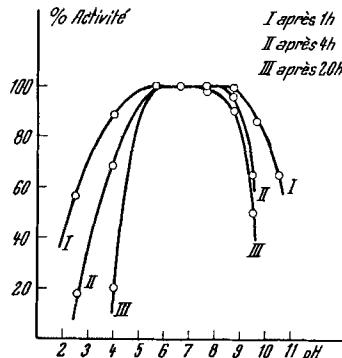


Fig. 2.

Stabilité en fonction du pH.

Le point isoelectrique, qui est nettement inférieur à ceux des autres α -amylases, n'a pu être déterminé avec précision, étant donné le peu de stabilité et la faible solubilité de l'enzyme à ce pH. Il doit se trouver aux environs de 4,2.

Spectre d'absorption. Comme pour les autres α -amylases, le spectre d'absorption de l'enzyme dans l'ultraviolet présente un maximum à 280 m μ et un point d'inflexion à 292 m μ (fig. 3).

Coefficient de température et énergie d'activation. L'activité de l'enzyme a été déterminée à pH 5,7 en fonction de la température. De la courbe rapportée dans la fig. 4, on trouve un coefficient de température de:

2 entre 0 et 10°	1,76 entre 20 et 30°
1,94 entre 10 et 20°	1,70 entre 30 et 40°

Les temps d'incubation ont été variés de 25 min. à 0° à 2 min. à 60° de telle façon qu'on ait toujours une dégradation du substrat d'env. 10%. Comme dans ces conditions, la vitesse reste constante au cours du temps, les valeurs réductrices obtenues ont été simplement divisées par celui-ci.

Des valeurs trouvées, nous avons calculé l'énergie d'activation de la réaction

selon *Arrhenius*. Comme nous l'avons fait ressortir dans une étude de l' α -amylase de malt¹), on peut difficilement parler, lors d'une

¹) Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, Helv. 34, 325 (1951).

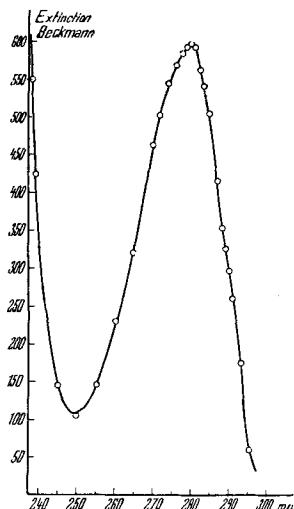


Fig. 3.

Spectre d'absorption.

α -amylolyse, d'une diminution de la concentration du substrat. Au contraire, si chaque scission amène la disparition d'une liaison glucosidique, elle entraîne parallèlement une augmentation d'une unité du nombre même des molécules de polysaccharide. Nous avons donc exprimé la vitesse de la réaction par le nombre de groupes réducteurs formés au cours du temps, en appliquant la relation

$$\ln \frac{v_2}{v_1} = \frac{A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

où v = mg maltose/min.

Comme l'indique la fig. 5, l'énergie d'activation est constante entre 0° et 40° et a une valeur de 10 650 cal/mole.

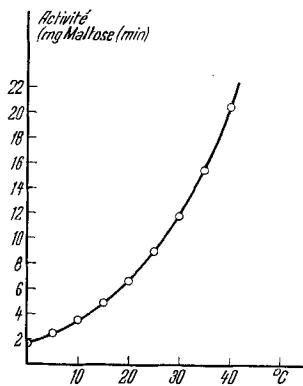


Fig. 4.
Activité en fonction de température.

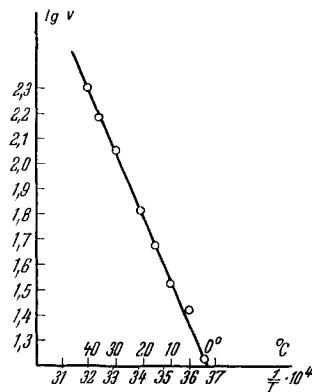


Fig. 5.
Energie d'activation.

Activation en fonction de la teneur en sels. Contrairement aux autres α -amylases, l' α -amylase d'A.O. n'est pas activée par des sels.

On sait que les α -amylases cristallisées de pancréas¹⁾ et de salive²⁾ humains et de pancréas de porc³⁾ ont besoin d'ions chlore pour montrer une pleine activité. L' α -amylase de bactérie (B. subtilis) est aussi légèrement activée par l'ion chlore, à de faibles températures⁴⁾. Par contre, l' α -amylase de malt nécessite la présence d'ions calcium⁵⁾. En fait, c'est principalement ce caractère qui permet de distinguer les différents types d'enzymes.

Une solution d' α -amylase d'A.O. a été dialysée à froid pendant 48 h. contre de l'acétate de Na 0,02-n. puis 72 h. contre de l'eau distillée. A la fin de la dialyse, la solution montre exactement la même activité. Afin de voir si l'on pouvait augmenter celle-ci, nous avons ajouté les sels suivants: MgSO₄, CaSO₄, CaCl₂, KCl, NaCl, phosphates et acétates de sodium et de potassium, mais sans résultats.

Pour bien montrer que l'ion Ca⁺⁺ n'est pas nécessaire à notre enzyme, nous avons étudié l'influence du «Complexon II»⁶⁾ sur son activité. Laissé une semaine à 0° et à pH

¹⁾ P. Bernfeld, F. Duckert & Ed. H. Fischer, Helv. **33**, 1064 (1950).

²⁾ P. Bernfeld, A. Staub & Ed. H. Fischer, Helv. **31**, 2165 (1948).

³⁾ Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv. **31**, 1831 (1948).

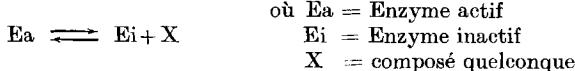
⁴⁾ Non encore publié.

⁵⁾ S. Schwimmer & A. K. Banks, J. Biol. Chem. **179**, 1063 (1949).

⁶⁾ Acide éthylénediamine-tétracarboxylique.

7,0 en présence de Complexon II 0,05-m., l'enzyme n'a montré aucune désactivation. Rappelons que sous ces mêmes conditions, l' α -amylase de malt est totalement désactivée en 30 min. déjà¹⁾.

Nous avons enfin envisagé la possibilité que notre enzyme puisse être lié à un autre composé pour former un système dissociable du type.



dans lequel seul le composé non dissocié Ea serait actif.

Afin de vérifier cette possibilité, nous avons fait agir des concentrations de plus en plus faibles d'enzyme sur un excès de substrat, en augmentant inversément le temps de réaction. En effet, dans les conditions habituelles du dosage, la vitesse de réaction est parfaitement proportionnelle et à la concentration de l'enzyme et au temps. En procédant comme nous l'avons fait, la quantité de groupes réducteurs libérés sera constante à condition que l'enzyme ne subisse aucune dissociation. Dans le cas contraire, toutes autres conditions restant égales, l'activité devrait tendre vers zéro. La fig. 6 montre que ceci n'est pas le cas.

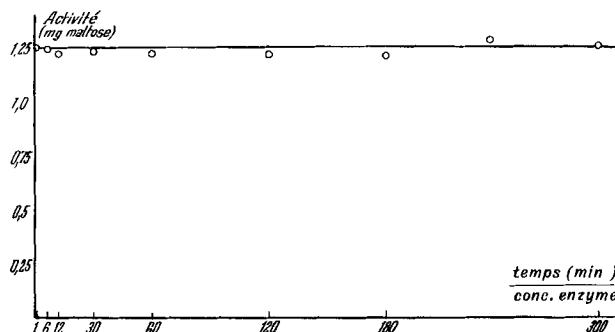


Fig. 6.

En conséquence, nous pouvons admettre que l'enzyme ne forme pas de système dissociable avec un composé indispensable à son activité.

Comparaison des propriétés des différentes α -amylases cristallisées. Le tableau suivant rapporte les propriétés de l' α -amylase d'A.O. ainsi que celles des autres α -amylases pures.

Comme on le voit, plusieurs propriétés de l' α -amylase d'A.O. sont bien intermédiaires entre celles des α -amylases de malt et de *B. subtilis*. Toutefois, l'enzyme d'A.O. se distingue nettement de ces dernières par son point isoélectrique plus bas et surtout par le fait qu'il ne nécessite pas la présence de sels pour montrer une pleine activité. En conséquence, il semble que cette amylase doive prendre une place à part parmi les α -amylases.

¹⁾ Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, Helv. 34, 325 (1951).

Tableau I.

	Propriétés des α -amylases cristallisées de				
	Malt	Asperg. Oryzae	Bacillus subtilis	Pancréas de porc	Salive et pancréas humains
Activité par mg N	2350	2400	3600	4000	6200
Activité par mg protéine . . .	315	310	500	630	980
% N	13,4	12,9	15,8	15,8	15,8
pH optimum d'action	4,7—5,4	5,5—5,9	5,3—6,8	6,9	6,9
pH optimum de stabilité . . .	4,9—9,1	5,5—8,5	4,8—8,5	7,0—8,5	4,8—11
Point isoélectrique	5,6	env. 4,2	?	5,3	5,3
Maximum d'absorption ($m\mu$) . .	280	280	280	280	280
Pouvoir saccharogène dextrinogène ($\pm 0,2$) . .	9,8	9,8	9,8	9,8	9,6
Activation par Ca ⁺⁺	+	--	--	--	--
Activation par Cl ⁻	—	—	+	+	+
Energie d'activation	7050	10650	13350 (0° à 15°) 9150 (15°—40°)	13500	13350

Partie expérimentale.

Stabilité en fonction du pH. Solutions-tampon:

1^o pH 2,5 à 4,1: lactate de sodium-acide lactique 0,1-m.

2^o pH 3,8 à 6,2: acétate de sodium-acide acétique 0,1-m.

3^o pH 5,6 à 8,2: phosphates de sodium et potassium 0,1-m.

4^o pH 7,8 à 10,6: glycocolle-NaOH 0,1-m.

On met dans une éprouvette 1 cm³ d'enzyme d'une activité d'env. 150 mg maltose/cm³, 5 cm³ de tampon, 3 gouttes de toluène et complète par de l'eau à 10 cm³. Le tube bouché est mis au thermostat à 20°. Aux temps voulus, on prélève 1 cm³, dilue à 10 cm³ par un tampon acétique de pH 5,7, 0,05-m., et dose l'activité sur 1 cm³ de cette solution diluée.

Activité en fonction du pH. On mélange dans une éprouvette 0,5 cm³ d'une solution d'amidon soluble selon Zulkowski à 2%, 0,5 cm³ des tampons 2 ou 3 selon le pH désiré et 1 cm³ de la solution d'enzyme d'une activité d'env. 1 mg maltose/cm³. Après 3 min. à 20°, on ajoute 2 cm³ d'une solution d'acide dinitrosalicylique¹) et dose le pouvoir réducteur comme décrit. En travaillant à des pH identiques avec 2 tampons différents, on obtient des valeurs réductrices égales, ce qui confirme que la nature même des sels utilisés n'a aucune influence sur l'activité.

Activité en fonction de la température. On prépare séparément une solution d'amidon Zulkowski à 1%, tamponnée à pH 5,7, et une solution d'enzyme d'une activité d'env. 0,3 mg maltose/cm³. Ces solutions sont portées préalablement à la température voulue variant de 5 en 5 degrés de 0 à 60°. Une fois la température atteinte, on mélange 1 cm³ de chaque solution. La réaction est bloquée aux temps voulus par addition de 2 cm³ de la solution d'ac. dinitrosalicylique, de telle façon que la dégradation atteigne dans tous les cas env. la même valeur.

Les électrophorèses ont été effectuées sur des solutions contenant 2 à 3% d'enzyme cristallisé, après dialyses de 4 jours entre 0 et 5° contre les tampons désirés ($\mu = 0,05$) contenant encore du NaCl ($\mu = 0,05$). Pour diminuer l'importance des gradients extraordinaires, on rajoute 8% d'eau à la solution de protéine.

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

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

RÉSUMÉ.

Les propriétés de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* cristallisée ont été décrites.

Certaines de ces propriétés sont intermédiaires entre celles des α -amylases cristallisées de malt et de bactérie. Comme ces dernières, l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* est une albumine. Sa solubilité dans l'eau est d'env. 10%. Son optimum de pH d'action se trouve entre 5,5 et 5,9; elle est relativement stable entre les pH 5,5 et 8,5.

Son spectre d'absorption présente un seul maximum à 280 m μ et un point d'infexion à 292 m μ . Son coefficient de température a été déterminé entre 0° et 40°. De ces valeurs, une énergie d'activation de 10650 cal/mole a été calculée.

Par contre, l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* se distingue nettement des autres α -amylases du fait que son activité n'est modifiée en rien par la présence de différents sels. Elle ne subit aucune désactivation, ni par dialyse prolongée, ni en présence de «Complexon II».

L'existence éventuelle d'un composé dissociable de l'enzyme avec une substance quelconque nécessaire à son activité a pu être écartée. Enfin son point isoélectrique, de l'ordre de pH 4,2, est de beaucoup inférieur à celui des autres α -amylases.

Les propriétés des α -amylases pures de différentes provenances ont été comparées.

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

241. Über eine Beziehung zwischen Verbrennungswärmen und Symmetriegruppen von Kohlenwasserstoffen

von Georg Karagounis.

(14. VIII. 51.)

Anlässlich einer Untersuchung über das Infrarotspektrum des freien Triphenylmethylradikales, über welche vor kurzem berichtet wurde¹⁾, haben wir abgeleitet, dass unter raumisomeren Verbindungen diejenige ein Energieminimum besitzt, welche die maximale Zahl an ultrarot-inaktiven Schwingungen aufweist. Diese Feststellung wurde so

¹⁾ Helv. 34, 994 (1951).