

137. Propriétés de l'invertase purifiée
par Ed. H. Fischer, Laure Kohtès¹⁾ et J. Fellig.

(27 IV 51)

Dans la communication précédente²⁾, nous décrivons une méthode de purification de l'invertase permettant d'enrichir l'enzyme 200 fois par rapport à l'azote et 25 fois par rapport aux hydrates de carbone de l'extrait brut. Le produit purifié, d'une teneur de 4 à 5% d'azote, contient encore 70% d'hydrates de carbone sous forme d'un polysaccharide.

Nous rapportons ici quelques propriétés de l'invertase purifiée ainsi que son comportement lorsqu'on la sépare du polysaccharide qui l'accompagne. Celui-ci a été isolé et étudié. Nous examinons enfin brièvement les rapports existant entre la protéine et le polysaccharide, et le rôle de ce dernier dans l'activité enzymatique.

Stabilité: Les solutions d'invertase d'un degré de pureté³⁾ de 4000 A/mg N et 250 A/mg S sont stables entre pH 4 et 6,5, conservées à froid en présence de toluène. Elles le sont beaucoup moins en milieu alcalin.

Le spectre d'absorption de l'invertase dans l'ultra-violet présente un seul maximum à 265 m μ entre pH 6 et 7 (fig. 1). En milieu alcalin, la solution jaunit, même à froid, probablement du fait de la présence du polysaccharide, et le spectre n'indique plus rien de caractéristique.

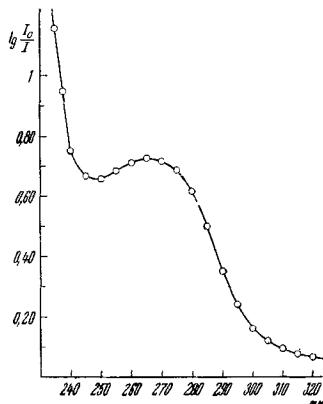


Fig. 1.

Spectre d'absorption de l'invertase purifiée (3950 A/mg N et 240 A/mg S), déterminé au «Beckman photoelectric quartz spectrophotometer». $c = 0,037$ mg N/cm 3 correspondant à 0,25 mg prot. + 0,6 mg polysaccharide par cm 3 . Cuve: 1 cm d'épaisseur.

¹⁾ Lauréate du «Concours interuniversitaire du Gouvernement Belge pour des Bourses de voyage».

²⁾ Ed. H. Fischer & Laure Kohtès, *Helv.* **34**, 1123 (1951).

³⁾ Les unités d'activité et le degré de pureté de l'invertase utilisés ici ont été définis dans la publication précédente.

L'électrophorèse du produit a été effectuée à différents pH. Entre 4,7 et 8,7, les diagrammes indiquent la présence d'un composant principal représentant plus de 80% de la totalité de la substance analysée. A des pH inférieurs à 4, par contre, la substance se sépare en deux composants (fig. 2).

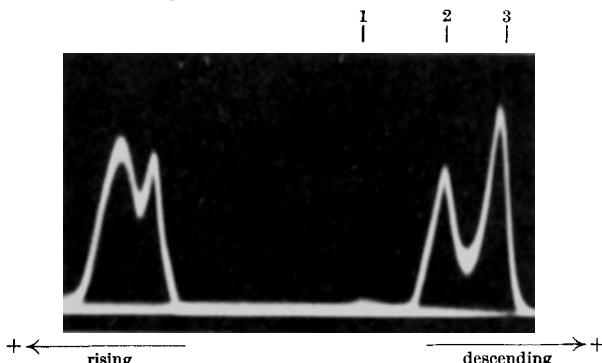


Fig. 2.

Diagramme électrophorétique (*Philpot-Svensson*) de l'invertase purifiée (4100 A/mg N et 180 A/mg S).

Tampon ac. lactique-lactate d'NH₄ + NaCl pH 3,5, $\mu = 0,1$.
Temp. 4,0° C, durée: 3600 sec. à 213 V, 15 mA.

Le tableau I rapporte les mobilités et les pourcentages des trois composants (calculé pour le «*descending*»).

Tableau I.

Composant	Mobilité (10 ⁻⁵ cm ² sec. ⁻¹ volt ⁻¹)	Pourcentage
1	+ 1,73	1,3
2	- 2,3	42,2
3	- 5,75	56,5

En fin d'électrophorèse, nous avons aussi bien que possible séparé les 2 composants qui s'étaient détachés et les avons dosés. Alors que la substance soumise à l'électrophorèse avait un degré de pureté de 4100 A/mg N et de 180 A/mg S, le composant 2 était passé à 515 A/mg S (donc enrichi de 3 fois par rapport aux hydrates de carbone) alors que le composant 3 était tombé à 22 A/mg S. Le composant 2, actif, est instable, et gardé à 0° perd progressivement son activité.

Cette électrophorèse montre que la fraction active est accompagnée d'au moins 40% d'un polysaccharide inactif qui semble associé à l'enzyme à des pH supérieurs à 4, mais s'en détache en dessous. Nous avons alors essayé de l'éliminer en effectuant des adsorptions aux env. du pH 3, en utilisant des échangeurs ioniques ou des adsorbants acides.

Elimination totale des hydrates de carbone. Toute une série d'adsorptions sur la bentonite effectuées entre pH 2,6 et 2,9 ont montré qu'il

était effectivement possible d'adsorber l'enzyme purifié en laissant après centrifugation une partie ou même la totalité du polysaccharide en solution. La suspension active d'enzyme sur la bentonite est instable, elle se désactive rapidement ou parfois même instantanément. Lorsqu'on la centrifuge, qu'on décante ensuite la liqueur contenant le polysaccharide et remet le culot en suspension dans un tampon de même pH, la désactivation est très forte. Enfin, tout essai tendant à éluer l'enzyme entraîne une perte totale et irréversible de l'activité.

Le tableau II rapporte une expérience type illustrant cette désactivation.

Tableau II.

Solution d'invertase à 4150 A/mg N et 240 A/mg S. Conc. finale après adsorption : 50 A/cm³.
Les dosages sont effectués immédiatement, à la fin de chaque opération.

Opération	pH	% de l'activité initiale
1. Invertase adsorbée sur bentonite*).	2,9	95
Après centrifugation, culot remis en suspension dans:		
2. Liqueur surnageante	2,9	77
3. Solution de glycérophosphate n.	2,9	31
Elution dans:		
4. Glycérophosphate n.	6,0	27
5. Eau	6,0	0

*) Un tube témoin, contenant cette suspension d'invertase sur la bentonite, garde la même activité tout au long de l'essai.

Nous avons cherché à stabiliser l'enzyme lors de l'adsorption ou de l'élution par une série d'agents: sels, ac. aminés, hexoses, ac. glucuronique, amidon, sorbitol, glycérol ou glycérophosphate, etc. Une certaine stabilisation temporaire peut être obtenue avec du sorbitol ou du glycérophosphate ou, plus faiblement, avec de l'alanine, mais sans que ces adjutants puissent empêcher une désactivation totale à la longue.

Action enzymatique: Deux communications préliminaires récentes décrivent l'apparition, lors de l'inversion du saccharose par l'invertase, de nouveaux saccharides dont les R_F ¹⁾ seraient inférieurs à ceux du glucose, du fructose ou du saccharose²⁾. Un trisaccharide non réducteur formé d'un glucose et de deux fructoses a été isolé par *Blanchard* et coll.³⁾ qui attribuent cette synthèse soit à une action plus complexe de l'invertase, soit à une impureté présente dans leurs solutions d'enzyme.

¹⁾ On désigne par R_F , dans une chromatographie, le quotient de la distance de migration d'une substance à celle du front du solvant.

²⁾ *J. S. D. Bacon & J. Edelmann*, Arch. Biochem. **28**, 407 (1950).

³⁾ *P. H. Blanchard & N. Albon*, Arch. Biochem. **29**, 220 (1950).

Nous avons entièrement confirmé ces observations avec notre préparation d'invertase purifiée. Trois oligosaccharides non réducteurs autres que le saccharose ont été décelés par chromatographie sur papier. Le tableau III rapporte les R_F des différents spots décelés sur le chromatogramme.

Tableau III.

Sucres	R_F	Sucres	R_F
Oligosaccharide I . . .	0,076	Saccharose	0,167
Oligosaccharide II . . .	0,094	Glucose	0,227
Oligosaccharide III . .	0,126	Fructose	0,270

Solvant: *n*-butanol-pyridine-eau 3:1:1,5. Temp. 25° C.

Les oligosaccharides I, II et III ont été élusés et hydrolysés et une chromatographie de l'hydrolysat a démontré qu'ils n'étaient constitués que de glucose et de fructose.

Ces observations nous font admettre que l'invertase (qui est une β -*D*-fructosidase) agit intermédiairement comme une transglucosidase et que la réaction enzymatique se déroule probablement comme suit:

1. Saccharose + enzyme \rightleftharpoons fructose-enzyme + glucose.
- 2a. Fructose-enzyme + saccharose \rightleftharpoons trisaccharide + enzyme.
- 2b. Fructose-enzyme + H_2O \rightarrow fructose + enzyme.

Nature du polysaccharide accompagnant l'invertase. Le polysaccharide a été séparé de l'enzyme après traitement à la bentonite. Il a ensuite été purifié par plusieurs traitements selon *Sevag*, longuement dialysé et séché par sublimation de la solution congélée. Il a aussi été préparé directement à partir d'une solution d'enzyme, après ébullition, selon *Sevag*.

La poudre blanche qu'on obtient est très peu soluble dans l'eau, dans les acides et dans les bases. Sa solubilité n'est pas influencée par la présence de sels. Elle est extrêmement résistante à la désagrégation par voie sèche, ce qui ne nous a pas permis d'en donner l'analyse centésimale. Elle contient moins de 0,2% d'azote (*Kjeldahl*) et de 0,1% P.

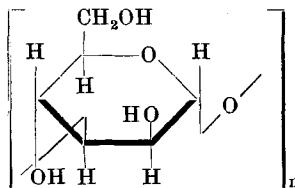
Sa rotation optique $[\alpha]_D^{20} = +73^\circ$ (conc. 0,2%, tube de 50 cm), indique des liaisons α dans le polysaccharide.

Hydrolyse: le polysaccharide est très difficilement hydrolysable. Moins de 3% de sucres réducteurs sont libérés par hydrolyse de 45 min. à 100° dans ClH n. Pour l'hydrolyser totalement, il faut le traiter au minimum pendant 6 h. à reflux dans ClH 3-n.

Les chromatographies sur papier du produit hydrolysé ont montré qu'il était exclusivement constitué de mannose. Le polysaccharide est donc un polymannane comme on en trouve habituellement dans la levure. Une seconde chromatographie effectuée sur un hydrolysat de l'enzyme purifié, avant la séparation du polysaccharide, a confirmé que le seul monose présent est bien le mannose.

Le degré de polymérisation du polymannane a été déterminé par réductométrie¹⁾, en admettant la présence d'un groupe aldéhydique libre par molécule. Un degré de polymérisation moyen de 48 a été trouvé, correspondant à un poids moléculaire chimique de 7770.

L'oxydation par l'ac. periodique du polymannane a montré qu'il consomme $7,5 \pm 1$ mole de periodate par molécule. L'oxydation du groupe terminal et du groupe réducteur exigeant déjà 5 moles de periodate, il résulte que le polysaccharide n'est pas attaqué le long de la chaîne. Une chromatographie des produits d'hydrolyse du polysaccharide oxydé permet effectivement de retrouver la presque totalité du mannose initial. Ceci n'est possible que si les restes de mannose sont rattachés exclusivement par des liaisons 1,3. En conséquence, le polymannane doit donc avoir la structure suivante:



Discussion.

Il ne fait pas de doute que dans les extraits de levure, l'invertase est liée à un polysaccharide. Celui-ci n'intervient pas dans l'activité enzymatique elle-même mais joue un rôle primordial dans la stabilité de l'enzyme. Lors de la purification de l'invertase, les solutions sont d'une stabilité remarquable tant qu'on ne diminue pas la quantité de polysaccharide au-dessous d'un certain seuil.

Pour nos solutions purifiées de 4000 A/mg N, ce seuil s'établit entre 200 et 250 A/mg sucre (correspondant à 70 % de polysaccharide), c'est-à-dire que si l'on dépasse cette valeur en éliminant les hydrates de carbone, la solution devient instable et perd progressivement son activité jusqu'à ce que le degré de pureté de l'enzyme reprenne sa valeur primitive vers 200 A/mg S. Cette désactivation due à une élimination trop poussée des polysaccharides explique le fait, souvent constaté, que plusieurs adsorptions successives entraînent toujours une certaine destruction de l'enzyme.

Nous ne savons pas pourquoi l'invertase pure est tellement instable ni comment le polysaccharide arrive à la stabiliser. Le fait que celui-ci soit un polymannane comme on en trouve en grande quantité dans la levure, et que l'on puisse en éliminer plus de 95 % sans que cela affecte en quoi que ce soit l'activité et la stabilité de l'enzyme nous fait douter de sa spécificité dans cette fonction.

¹⁾ K. H. Meyer, P. Bernfeld, P. Gürtler & G. Noeling, *Helv.* **31**, 108 (1948); S. Lansky, M. Kooi & T. J. Schoch, *Am. Soc.* **71**, 4066 (1949); K. H. Meyer, J. Fellig & Ed. H. Fischer, *Helv.* **34**, 939 (1951).

L'enzyme a certes une grande affinité pour ce polymannane, mais il est possible qu'il puisse également former des combinaisons stables avec d'autres substances. Cela expliquerait les résultats de *Hudson*¹⁾ (que nous n'avons d'ailleurs pas pu confirmer avec notre levure) qui affirme avoir obtenu un enzyme pratiquement exempt de polysaccharide. Comme *Hudson* procède d'emblée, sur un jus brut dialysé, à l'élimination des hydrates de carbone, on pourrait admettre qu'il remplace le polysaccharide par un autre stabilisateur, vraisemblablement de nature protéique.

En conclusion, nous ne croyons pas qu'il faille considérer l'invertase de levure comme un composé polysaccharide-protéine²⁾, mais bien comme une protéine hautement instable à l'état pur, mais qui peut être stabilisée en étant combinée à d'autres substances, principalement à un polymannane pour lequel elle a une très grande affinité.

Partie expérimentale.

Mise en évidence des produits de réaction de l'invertase. On fait réagir à 20° une solution d'invertase à 4000 A/mg N et 240 A/mg S sur une solution de saccharose à 10 ou 20%. On prélève de dix en dix minutes pendant 1 h. des échantillons qu'on porte à ébullition pour stopper la réaction. Les solutions obtenues sont chromatographiées sur papier *Whatman* N° 1, selon la méthode descendante³⁾ avec deux solvants à phases entièrement miscibles: alc. *iso*-amylque-pyridine-eau 5:4:1 et *n*-butanol-pyridine-eau 3:1:1,5⁴⁾, ainsi qu'avec un solvant à deux phases⁵⁾: acétate d'éthyle-pyridine-eau 2:1:2.

Les sucres réducteurs ont été révélés par le réactif au phthalate d'aniline⁶⁾; les oligosaccharides non réducteurs par le réactif suivant: ac. trichloracétique 10 g, benzidine pure 0,5 g, *n*-butanol saturé d'eau 100 cm³. Le réactif est vaporisé sur le papier et ce dernier chauffé pendant 15 min. à l'étuve à 105°.

Comme indiqué⁷⁾, la conc. maximum en oligosaccharide s'obtient lorsque 60% du saccharose ont été hydrolysés.

Les oligosaccharides isolés par chromatographie ont été élus par de l'eau, hydrolysés 1 h. au bain-marie par CIH 0,5-n., puis rechromatographiés après concentration de l'hydrolysat sous pression réduite.

Détermination de la nature du polysaccharide de l'invertase. Le polysaccharide est hydrolysé pendant 8 h. par CIH 3-n. au bain-marie dans une atmosphère d'hydrogène. La solution est évaporée à sec à pression réduite et le résidu repris par 0,2 cm³ d'eau. L'invertase purifiée est hydrolysée pendant 36 h. par CIH 3-n. dans une ampoule scellée, au bain-marie. L'hydrolysat est traité comme ci-dessus. Les chromatographies sur papier sont effectuées comme indiqué.

Détermination du poids moléculaire du polysaccharide. A 2 cm³ d'une solution neutre contenant respectivement 20, 50 et 100 mg de polysaccharide, on ajoute 2 cm³ du réactif à l'acide dinitro-3,5-salicylique décrit dans la publication précédente. La solution est mélangée et les tubes sont portés au bain-marie à 65° pendant 60 min. On centrifuge si nécessaire, puis détermine l'extinction au photomètre de *Klett*, filtre vert N° 54. L'extinction obtenue est rapportée à une courbe-étoile établie avec du mannose traité dans les mêmes conditions.

¹⁾ *M. Adams & C. S. Hudson*, Am. Soc. **65**, 1359 (1943).

²⁾ *J. B. Sumner & D. J. O'Kane*, Enzymologia **12**, 251 (1948).

³⁾ *S. M. Partridge*, Biochem. J. **42**, 238 (1948).

⁴⁾ *A. Jeanes, C. S. Wise & R. J. Dimler*, Ann. Chem. **23**, 415 (1951).

⁵⁾ *M. A. Jermyn & F. A. Isherwood*, Biochem. J. **44**, 402 (1949).

⁶⁾ *S. M. Partridge*, Nature **164**, 443 (1949).

⁷⁾ *P. H. Blanchard & N. Albon*, Arch. Biochem. **29**, 220 (1950).

*Oxydation par l'ac. periodique*¹⁾. A 200 mg du polymannane suspendu dans 10 cm³ d'eau, on ajoute 10 cm³ d'une solution de métaperiodate de sodium 0,25-m. dans un tampon acétique 0,05-m., de pH 4,5. Le mélange est conservé à l'obscurité à 0°. La consommation de periodate est déterminée toutes les 24 h. sur des prises de 0,2 cm³, ceci pendant 10 jours. Quand l'oxydation est terminée, l'excès de periodate est détruit par l'éthylène-glycol et la solution additionnée de 2 fois son volume d'acétone. Le précipité obtenu est suspendu dans 3 cm³ d'eau et dialysé 12 h. contre de l'eau distillée, pour éliminer l'iodate. Après dialyse, on ajoute ClH à la suspension jusqu'à une normalité de 3, et la porte 3 h. à reflux au bain-marie dans un courant d'hydrogène. La solution est évaporée à sec sous pression réduite, le résidu repris dans 0,2 cm³ d'eau et analysé par chromatographie sur papier.

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

L'un de nous (*L. K.*) remercie vivement le «*Comité du Concours interuniversitaire du Gouvernement Belge pour des Bourses de voyage*» de l'appui généreux qu'il lui a donné.

RÉSUMÉ.

Les propriétés d'une invertase purifiée sont décrites.

1^o L'enzyme est stable entre pH 4 et 6,5, et son spectre d'absorption présente un seul maximum, à 265 m μ .

2^o L'électrophorèse effectuée à plusieurs pH indique la présence d'un seul composant au-dessus de 4. A pH 3,5 celui-ci se sépare en deux composants dont l'un est formé d'un polysaccharide inactif et l'autre, d'enzyme + polysaccharide.

3^o Par adsorption sur la bentonite à pH 2,9, on peut éliminer la totalité des hydrates de carbone, mais ceci entraîne la désactivation plus ou moins rapide de l'enzyme. Cette désactivation n'a pu être évitée par différents adjuvants.

4^o La formation, lors de l'inversion du saccharose par l'enzyme purifié, de 3 oligosaccharides non réducteurs a été confirmée. On doit donc admettre que l'invertase agit également comme une transglucosidase.

5^o Le polysaccharide accompagnant l'enzyme a été isolé; il est peu soluble et difficilement hydrolysable. Des chromatographies sur papier ont montré la présence exclusive de mannose. Ce polymannane a un degré de polymérisation moyen de 48, correspondant à un poids moléculaire chimique de 7770.

6^o L'oxydation à l'ac. periodique du polysaccharide et la rotation optique indiquent que les restes de mannose sont liés en α -1,3.

7^o Les rapports entre le polysaccharide et l'enzyme ont été examinés. On en a conclu que l'invertase de levure n'est pas un composé protéine-polysaccharide, mais bien une protéine labile stabilisée par la présence d'un polymannane.

Laboratoires de Chimie Organique
et Inorganique de l'Université, Genève.

¹⁾ *K. H. Meyer & P. Rathgeb*, *Helv.* **32**, 1102 (1949); *G. C. Gibbons & R. A. Bois-sonnas*, *Helv.* **33**, 1477 (1950).