

10. Sur les enzymes amylolytiques (I).

L'isolement de l' α -amylase de pancréas

par Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld.

(31 VII 46)

Dans le cadre de nos recherches sur l'amidon, nous avons été amenés à étudier les enzymes amylolytiques; c'est l' α -amylase de pancréas qui fait l'objet de ce premier travail.

L' α -amylase dégrade l'amidon et le glycogène. Elle scinde les liaisons α 1,4 glucosidiques à un endroit quelconque de la molécule. Il s'ensuit une baisse rapide du poids moléculaire de l'amidon et, par conséquent, de la viscosité. Les liaisons des groupes terminaux sont hydrolysées beaucoup plus lentement. Ce n'est qu'en fin de réaction qu'apparaissent le maltose, le glucose et un mélange d'oligosaccharides.

Enrichissement: La purification de l' α -amylase a déjà fait l'objet de nombreux travaux donc nous ne citerons que les plus importants.

*Sherman*¹⁾ extrait la pancréatine du commerce par de l'alcool à 50%, précipite l'extrait par de l'alcool pur, redissout le précipité et le reprécipite par de l'alcool-éther. Il dialyse ensuite le flocculat remis en solution dans de l'alcool à 50% pendant 3 jours, élimine une substance insoluble et précipite la solution dialysée, limpide, par de l'alcool-éther. Il obtient ainsi^{2) 3)}, après lavage à l'éther et séchage, une protéine très active qui donne à l'analyse: C 51,9%, H 6%, N 15,3%, S 1%, P 0,8%.

En 1931, *Caldwell, Sherman* et coll.⁴⁾ ont annoncé dans une publication préliminaire avoir cristallisé un corps très actif et très instable; mais ceci n'a pas été confirmé depuis.

Willstätter, Waldschmidt-Leitz et coll.⁵⁾ ont utilisé pour la purification de l'amylase la méthode d'adsorption sélective. La glande fraîche est dégraissée à l'acétone, séchée, finement broyée puis extraite par de la glycérine à 87%; l'extrait est finalement précipité par de l'alcool. La lipase est alors éliminée par adsorption sur de l'hydroxyde d'aluminium en milieu acide, la trypsine sur du kaolin en milieu faiblement acétique. L'enzyme purifiée est excessivement instable et ne peut être conservée qu'en présence de glycérine.

*Holmbergh*⁶⁾ a étudié l'adsorption sélective des amylases sur l'amidon. L'amylase du pancréas a pu être adsorbée et enrichie.

¹⁾ *Sherman, H. C., Schlesinger, M. D.*, Am. Soc. **33**, 1195 (1911); *Sherman, Caldwell, M. et Adams, M.*, Am. Soc. **48**, 2947 (1926); *Sherman, Adams, J.* Biochem. **88**, 195 (1930).

²⁾ *Sherman, H. C., Gettler, A. O.*, Am. Soc. **35**, 1790 (1913).

³⁾ *Sherman, Schlesinger*, Am. Soc. **33**, 1195 (1911).

⁴⁾ *Caldwell, M. L., Bocher, L., Sherman, H. C.*, Sci. **74**, 37 (1931).

⁵⁾ *Willstätter, R., Wild, L.*, Z. physiol. Ch. **125**, 132 (1923); id. plus *A. R. F. Hesse*, ibid. **126**, 43 (1923); *Willstätter, R., Wild, L.*, ibid. **142**, 14 (1924).

⁶⁾ *Holmbergh, O.*, Bioch. Z. **258**, 134 (1933); **266**, 203 (1933); Svensk. kem. Tidskr. **50**, 258 (1938).

Toutes ces purifications n'ont pas pu être poursuivies vu la très grande instabilité de l'enzyme, instabilité allant croissant avec l'état de pureté du produit.

Les propriétés de l'enzyme ont été également traitées dans de nombreux travaux, mais tout ce qui a été dit sur l'activation et la désactivation de l'enzyme est plus ou moins sujet à caution.

Désactivation. Tous les auteurs indiquent que l' α -amylase est très peu stable. L'enzyme se désactive par dialyse; mais il semble qu'on n'ait jamais étudié de façon systématique ni ces désactivations, ni une réactivation possible. Plusieurs travaux ont été effectués pour trouver des corps stabilisateurs, mais sans beaucoup de résultats: on n'est arrivé qu'à ralentir la désactivation¹⁾. *Sherman*²⁾ a étudié l'action des acides aminés, qui semblent agir surtout en protégeant l'enzyme de l'action de la chaleur avant et pendant le dosage d'activité³⁾.

Le Hg⁴⁾, le Cu⁵⁾ ⁶⁾, le Cd⁷⁾, l'hydroxylamine, le molybdate d'ammonium, le tungstate de sodium, l'aniline sont des poisons de l'enzyme⁸⁾.

Effecteurs et inhibiteurs. Nous appellerons selon *Bersin*⁹⁾ « effecteurs » et « inhibiteurs » les corps influençant la vitesse de réaction de l'enzyme sur le substratum, et « activateurs » et « désactivateurs » ceux qui n'agissent que sur l'enzyme elle-même.

Tous les halogénures (sauf les fluorures) des métaux alcalins, ainsi que ceux du Mg, Ca, Ba, accélèrent l'hydrolyse de l'amidon¹⁰⁾ ¹¹⁾. L'action est la plus marquée pour le NaCl, avec un maximum entre les concentrations de M/150 et M/300¹²⁾ ¹³⁾. Les acétates, borates, citrates et phosphates sont sans action en présence de NaCl¹⁴⁾. Les iodures (et les fluorures) deviennent des inhibiteurs de la réaction à de fortes concentrations¹⁰⁾. La vitesse de la dégradation de l'amidon¹⁵⁾ ¹⁶⁾ dépend aussi du p_H dont l'optimum varie avec la concen-

1) *Willstätter, R., Rohdewald, M., Z. physiol. Ch. 222, 202 (1933).*

2) *Sherman, H. C., Caldwell, M., Am. Soc. 43, 2469 (1921); Sherman, Walker, F., Am. Soc. 43, 2461 (1921); Sherman, Caldwell, Am. Soc. 44, 2926 (1922).*

3) *Sherman, H. C., Walker, F., Am. Soc. 45, 1960 (1923); Sherman, Adams, M., J. Biochem. 88, 195 (1930).*

4) *Olsson, U., Z. physiol. Ch. 117, 91 (1921).*

5) *Muckerji, B., Igemgar, N. K., Indian J. med. Res. 26, 289 (1938).*

6) *Sherman, H. C., Wayman, M., Am. Soc. 43, 2454 (1921).*

7) *Myrbäck, K., Z. physiol. Ch. 159, 1 (1926).*

8) *Sherman, H. C., Naylor, N., Am. Soc. 44, 2957 (1922).*

9) *Bersin, Lehrb. der Enzymologie, Leipzig 1938.*

10) *Clifford, W. M., Biochem. J. 30, 2049 (1936).*

11) *Haarmann, W., Bartscher, Bioch. Z. 283, 301 (1936).*

12) *Willstätter, R., Wild, L., Hesse, A. R. F., Z. physiol. Ch. 126, 143 (1923).*

13) *Sherman, H. C., Kendall, E., Clark, E., Am. Soc. 32, 1073 (1910).*

14) *Sherman, H. C., Caldwell, M., Dale, J., Am. Soc. 49, 2596 (1927).*

15) *Pronin, S. J., Bull. Biol. med. exp. URSS. 4, 65 (1937); Biochimia 3, 633 (1939).*

16) *Euler, H. v., Svanberg, O., Z. physiol. Ch. 112, 193 (1921).*

tration en sels¹⁾²⁾, ainsi qu'avec le température³⁾. Les conditions les meilleures sont: p_H de 6,9 (phosphates⁴⁾, une concentration en NaCl de M/150 et une température de 35°⁵⁾.

Dosage de l'activité. L'activité amyliatique est déterminée en mesurant la dégradation de l'amidon par des méthodes viscosimétriques⁶⁾⁷⁾ ou néphélométriques⁸⁾⁹⁾, par la réaction colorée avec l'iode¹⁰⁻¹³⁾ ou mieux en dosant les groupes réducteurs libérés par l'hydrolyse¹⁴⁾¹⁵⁾. Dans ce cas, la valeur réductrice est en général exprimée en maltose, comme si la totalité du pouvoir réducteur était due à ce sucre.

Unités d'activité. Il n'existe pas encore d'unité universellement adoptée.

100 unités «*Lintner 1*»¹⁶⁾ représentent l'activité qu'auraient 0,12 mgr. d'enzyme sèche qui, agissant pendant une heure à température ordinaire sur 10 cm³ d'une solution d'amidon soluble à 2%, produiraient suffisamment de sucre pour réduire 5 cm³ d'une solution de *Fehling*.

L'unité «*Lintner 2*»¹⁷⁾ est la quantité de maltose produite par 100 mgr. d'enzyme sèche agissant pendant 30 min. à 20° sur 100 cm³ d'une solution à 2% d'amidon soluble.

L'unité «*New-Scale*» de *Sherman*¹⁸⁾ est la quantité de maltose formée par action de l'enzyme pendant 30 min. à 40° sur 2 gr. d'amidon soluble, divisée par la quantité d'enzyme employée.

D'après *Euler*¹⁹⁾, la réaction de l'amylase sur l'amidon est monomoléculaire lorsque la dégradation du substratum est inférieure à 40% (et que l'on travaille dans des limites bien établies de concentration en enzyme et substratum).

*Euler et Svanberg*²⁰⁾ ont alors exprimé l'activité de l'amylase en «*Sf*»:

$$Sf = \frac{k \times \text{gr. maltose}}{\text{gr. prod. actif}}$$

¹⁾ *Myrbäck, K.*, Z. physiol. Ch. **15**, 1 (1926).

²⁾ *Sherman, H. C., Kendall, E., Clark, E.*, Am. Soc. **32**, 1087 (1910); *Sherman, H. C., Caldwell, M., et Adams, M.*, Am. Soc. **50**, 2529 (1928); idem. **50**, 2539 (1928).

³⁾ *Firdmann, J.*, Ann. phys. physico-chim. biol. **14**, 67 (1938).

⁴⁾ *Sherman, H. C., Thomas, A., Baldwin, M.*, Am. Soc. **41**, 231 (1919).

⁵⁾ *Clifford, W. M.*, Biochem. J. **30**, 2049 (1936).

⁶⁾ *Chrzaszcz, T.*, Bioch. Z. **242**, 130 (1931); *Chrzaszcz, T., Janicki, J.*, Bioch. Z. **256**, 252 (1932).

⁷⁾ *Josza, S., Gore, H. C.*, Ind. Eng. Chem. Anal. **2**, 26 (1930).

⁸⁾ *Rona, P., van Eweyk, C.*, Bioch. Z. **149**, 174 (1924).

⁹⁾ *Remesow, J. A.*, Arch. Sci. biol. (russ.) **37**, 425 (1935).

¹⁰⁾ *Wohlgemuth, J.*, Bioch. Z. **9**, 1 (1908).

¹¹⁾ *Blom, J., Bak, A., Braae, B.*, Z. physiol. Ch. **250**, 103 (1937).

¹²⁾ *Sabalitschka, Th., Weidlich, R.*, Bioch. Z. **207**, 477 (1929).

¹³⁾ *Giri, K. V.*, Sci. **81**, 343 (1935).

¹⁴⁾ *Bertrand, G.*, Bl. [3] **35**, 1285 (1906).

¹⁵⁾ *Willstätter, R., Schudel, G.*, B. **51**, 780 (1918).

¹⁶⁾ *Lintner, C. J.*, J. pr. [2] **34**, 383 (1886).

¹⁷⁾ *Lintner, C. J.*, Z. ges. Brauwesen **31**, 421 (1908).

¹⁸⁾ *Sherman, H. C., Kendall, E., Clark, E.*, Am. Soc. **32**, 1073 (1910).

¹⁹⁾ *Euler, H. v., Josephson, K.*, B. **56**, 1749 (1923).

²⁰⁾ *Euler, H. v., Svanberg, O.*, Z. physiol. Ch. **112**, 193 (1921).

où gr. maltose = quantité de maltose pouvant être formée dans la première phase de la réaction, soit 75% de la quantité d'amidon; k = constante d'équilibre de la réaction monomoléculaire

$$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$$

où t = temps en min.

a = 75% de la quantité d'amidon mis en jeu

x = maltose anhydre formé au temps t.

Le dosage se fait à 37°, à l'optimum de p_H (pour l'amylase de malt à p_H 5), en variant la concentration de l'amidon soluble entre 0,72 et 2,8%, et la concentration d'enzyme de façon à obtenir des valeurs de k entre 0,004 et 0,08.

L'unité «Fz» de Lüers et Sellner¹⁾ est semblable au «Sf» mais l'analyse s'effectue à 20° sur de l'amidon à 3%.

Les unités de Willstätter sont²⁾:

1. L'«Amylase-Einheit» qui est 100 fois la quantité de substance active donnant une valeur de k = 0,01 lorsqu'on fait agir l'enzyme à 35° sur 0,025 gr. d'amidon soluble dans un volume total de 37 cm³.

2. L'«Amylase-Wert» qui est la quantité d'«Amylase-Einheiten» dans 10 mgr. de produit.

1000 unités «New Scale» correspondent³⁾ à 38,5 «Sf», à 2,05 «Am. W.», à 44,3 «Fz.», à 1500 unités «Lintner 1» et à 110000 unités «Lintner 2».

Extraction de l'enzyme.

Nous avons choisi comme produit de départ le pancréas de porc. En plus de protéines biologiquement inactives, la glande contient de l'insuline, des nucléoprotéides⁴⁾ et éventuellement leurs produits de scission⁵⁾, et une vingtaine d'enzymes. Parmi ces dernières, en plus de la lipase, la pepsine, la trypsine, etc., on trouve pratiquement toutes les enzymes nécessaires à la dégradation totale des protéines (protéases, polypeptidases, désaminases, aminooxydases, décarboxylases, etc.).

Il ne faut pas extraire la glande grossièrement dégraissée et hachée, de fortes quantités de graisse intriquée dans la glande empêchant toute centrifugation. Comme on ne peut d'autre part extraire la graisse sans déshydrater le brai, il faut le sécher auparavant. On obtient ainsi une poudre grossière, stable pendant au moins une année au frigidaire, d'une teneur de 15,7 à 16,5% d'azote: elle sert de produit de départ pour la purification. Il n'est pas nécessaire de la broyer.

Nous avons cherché les meilleures conditions d'extraction du produit actif. L'acétate de sodium 0,5 n donne d'excellents résultats, à un p_H entre 7,2 et 6,6. Avec la glycérine, souvent utilisée, on obtient

¹⁾ Lüers, H., Sellner, Wschr. Brauerei **17**, 97 (1925).

²⁾ Willstätter, R., Wild, L., Z. physiol. Ch. **125**, 132 (1923); id. plus A. R. F. Hesse, ibid. **126**, 43 (1923); Willstätter, R., Wild, L., ibid. **142**, 14 (1924).

³⁾ F. Nord, R. Weidenhagen, „Handbuch der Enzymologie“ p. 559, Leipzig (1940).

⁴⁾ Hammarsten, O., Z. physiol. Ch. **19**, 19 (1894).

⁵⁾ Steudel, H., Z. physiol. Ch. **231**, 273 (1935).

les mêmes rendements, mais son emploi rend difficile toute manipulation ultérieure; le rendement obtenu par extraction à l'eau est d'environ 50 % inférieur. Sous une agitation modérée à 3°, l'extraction à l'acétate est pratiquement terminée après 35 heures. Une agitation trop violente produit des baisses d'activité atteignant 50 %.

Comportement de l'extrait brut.

Conformément aux données de la littérature, nous trouvons un optimum d'activité entre p_H 6,5 et 6,9.

Le NaCl est un effecteur, avec optimum d'action à une concentration de M/150 (fig. 1).

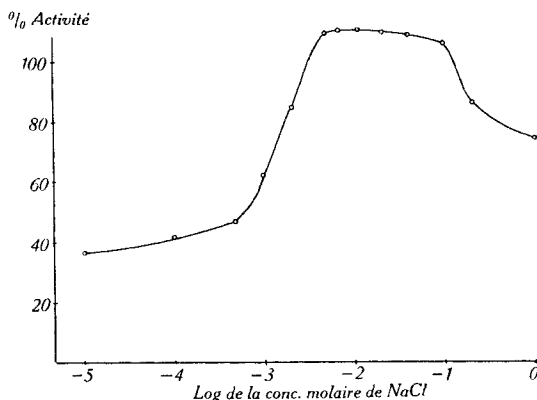


Fig. 1.

Activité amylatique en fonction de la concentration en NaCl, en présence de tampon phosphate M/50, $p_H = 6,9$.

L'enzyme se désactive très rapidement à un p_H inférieur à 6,5 et supérieur à 9.

La perte d'activité par congélation est de 10 % environ; elle atteint 60—80 % lors d'une dessiccation du produit congelé par sublimation. La dessiccation par précipitation acétonique ou alcoolique, suivie d'un lavage à l'éther, détruit 90 % du produit actif.

La composition chimique de l'extrait brut varie considérablement selon l'état de la glande. Ces variations proviennent d'une autolyse que subit le pancréas et qui débute au moment même de la mort de l'animal. En effet, les extraits provenant de glandes toutes fraîches ne contiennent que très peu de substances organiques ayant de l'azote aminé libre, tandis que les extraits de glandes qui ont séjourné quelques heures à température ordinaire après la mort de l'animal en contiennent une quantité considérable (voir tableau 1).

Tableau 1.

Fraîcheur de la glande*)	Activité de l'extrait exprimée par le quotient mgr. maltose par cm ³ d'extrait.	Activité de la substance extraite exprimée par le quotient mgr. maltose par mgr. d'azote	% de substance extraite calculé d'après l'azote	Rapport de l'azote aminé libre sur l'azote total dans l'extrait
15 minutes . . .	195	135	15—20	0,12—0,13
5 heures	1300	200	70—77	0,37
24 heures	1300	200	70—77	0,37
10 jours**) . . .	860	135	55—65	0,59

*) Nous exprimons la fraîcheur de la glande par le temps qui sépare la mort de l'animal du moment où nous portons le pancréas à 0°, température à laquelle l'autolyse est très ralentie. La glande est alors immédiatement hachée et séchée.

**) La glande broyée a été laissée 10 jours à température ordinaire; le brai a été gardé sous du toluène.

En soumettant l'extrait brut à la dialyse, on trouve que près de 80% des produits azotés de l'extrait sont dialysables et consistent surtout en peptides inférieurs et en acides aminés libres.

Enrichissement.

Nous nous sommes principalement servis de précipitations fractionnées. Après avoir établi par des essais préliminaires quel agent précipitant serait indiqué à chaque stade de la purification, nous avons systématiquement étudié pour chaque opération les conditions les meilleures: la concentration en protéines, la teneur en sels, la température, le p_H , la durée de précipitation et la vitesse d'agitation. (voir les travaux de *Cohn* et coll.¹⁾). Interviennent encore, lorsqu'on précipite de petites quantités de solution, la forme de l'agitateur et du récipient, la manière d'introduire le liquide précipitant, etc. Nous avons dû renoncer à tout traitement à un p_H inférieur à 6, et à l'usage des alcools qui semblent — même à basse température — désactiver rapidement l'enzyme.

Nous avons d'abord utilisé des précipitations fractionnées à l'acétone à un p_H et une teneur en sel déterminés; puis des précipitations au sulfate d'ammonium à p_H 6,9. Une forte perte d'activité survient lorsqu'on ajoute la solution de sulfate d'ammonium goutte à goutte; on obtient par contre un bon rendement en ajoutant d'un coup la quantité voulue de la solution. Ce même phénomène a été observé par *Coulthard*²⁾ avec la notatine, et par *Gale* et *Epps*³⁾ avec l'amino-décar-

¹⁾ *Cohn, E. J.*, *Medicine* [3] **24**, 333 (1945).

²⁾ *Coulthard, C. E.* et coll., *Biochem. J.* **39**, 24 (1945).

³⁾ *Epps, H. M. R.*, *Biochem. J.* **38**, 242 (1944).

boxylase. Un produit déjà très enrichi a pu être avantageusement traité selon la méthode de *Sevag*¹⁾, qui consiste à secouer fortement la solution d'enzyme avec du chloroforme en présence d'alcool amylique. Les protéines sont dénaturées et se trouvent, après centrifugation, coagulées dans l'interface eau-chloroforme.

L'enzyme se désactive spontanément en solution aqueuse ou saline; ce comportement avait rendu impossible jusqu'à présent l'isolement de l' α -amylase pure. Nous avons réussi à supprimer cette désactivation par un stabilisateur contenu dans une solution d'enzyme bouillie.

L'enzyme est en outre désactivée et dégradée par dialyse, ce qui empêche l'utilisation de ce procédé pour l'élimination des sels qui gênent l'analyse électrophorétique. Le sulfate d'ammonium qui accompagne les précipités, contrairement à l'acétate d'ammonium, ne peut être séparé de l'enzyme par des précipitations à l'acétone. Nous avons surmonté cette difficulté en échangeant l'ion SO_4'' ainsi que d'autres anions gênants contre l'ion $\text{CH}_3\text{COO}'$, par un traitement avec un échangeur d'ions basique (Wofatite M), chargé préalablement par de l'acétate.

Nous sommes ainsi finalement arrivés à une prescription comportant 8 stades et conduisant à un produit dont la pureté n'a pu être augmentée par aucun fractionnement ultérieur (voir tableau 2).

Le produit a été soumis à une analyse électrophorétique, effectuée par M. le docteur *Erwin Wiedemann* aux laboratoires de chimie pharmaceutique (prof. Dr. *A. Stoll*) de *Sandoz A.G.* à Bâle. L'électrophorèse a donné le diagramme représenté par la figure 2.

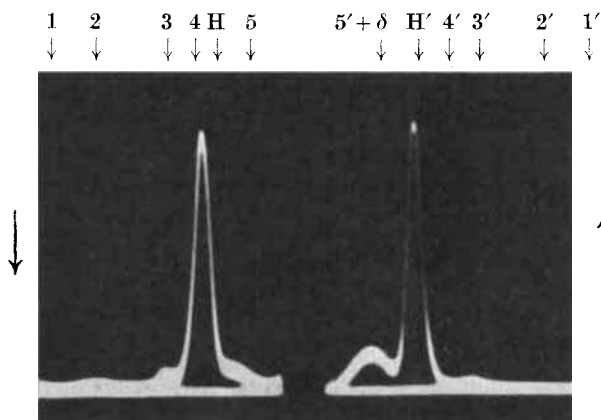


Fig. 2

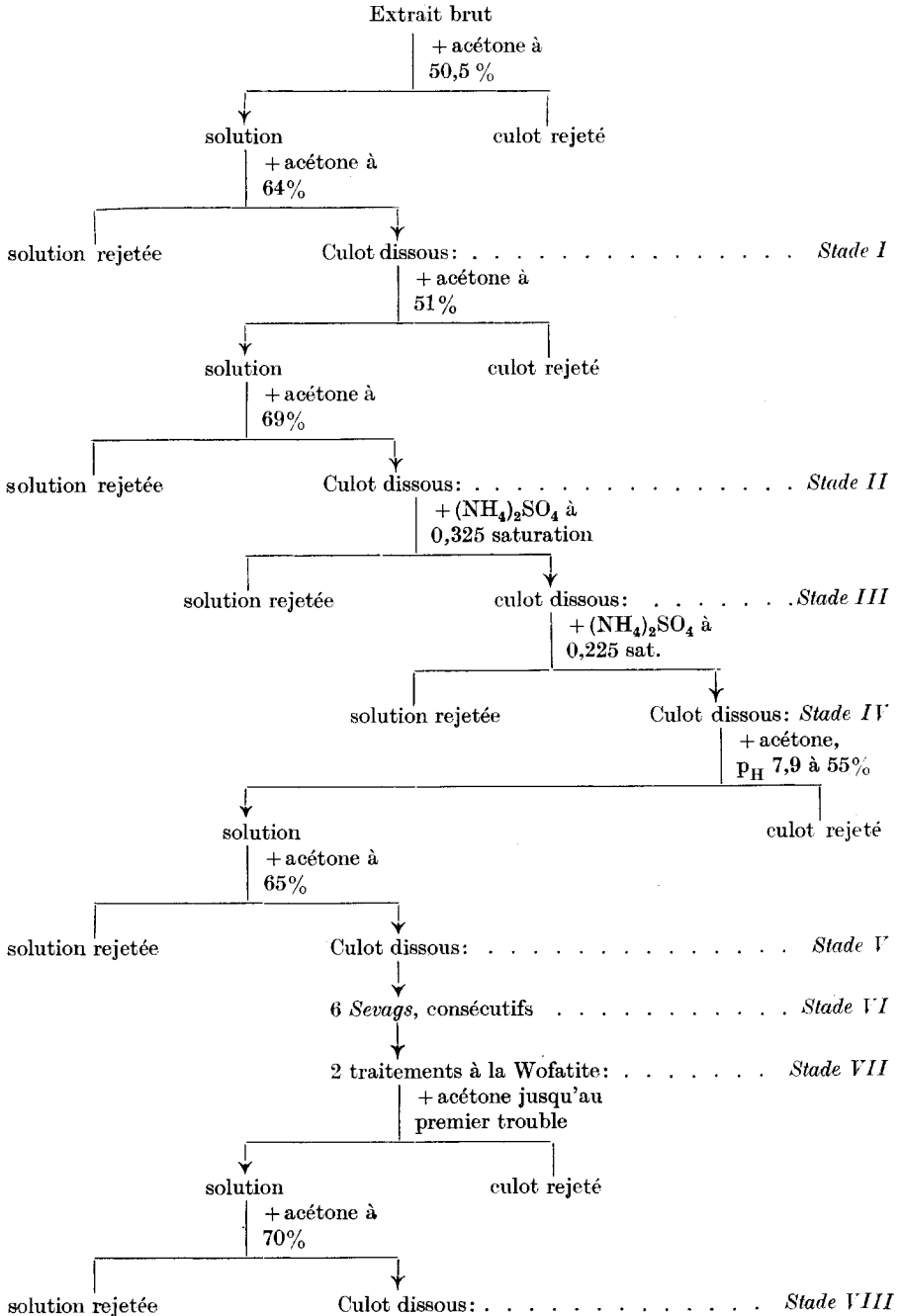
Diagramme électrophorétique (*Philpot-Svensson*) de l' α -amylase de pancréas.

Tampon de *Michaelis*, $p_H = 7,9$; $\mu = 0,1$; Température $2,0^\circ \text{C}$.

Durée: 4920 sec. à 3,944 Volts/cm. δ est l'anomalie habituelle à «l'ascending boundary» (\uparrow)

¹⁾ *Sevag, M.*, *Bioch. Z.* **273**, 419 (1934).

Tableau 2
Schéma de la purification



M. *Wiedemann* a calculé la composition du produit:

composant	teneur en %	mobilité u en $\frac{\text{cm}^2}{\text{sec.} \times \text{Volt}} \times 10^5$
1	1,2	14,43
2	1,9	10,93
3	4,2	7,73
4	2,3	4,95
H	83,5	3,09
5	6,9	1,03

Le produit consiste donc presque entièrement en H; ce composant ne peut pas être scindé par électrophorèse à différents p_H (6,9 et 7,5); il s'agit donc d'une substance pure.

L'enzyme.

Le produit final donne sous nos conditions d'analyse 600 mgr. de maltose hydraté par mgr. d'enzyme (soit par 0,149 mgr. d'azote). L'activité par mgr. d'azote est 23 fois supérieure à celle de l'extrait brut. Notre produit semble donc être 3 fois plus actif que le produit le plus riche de *Sherman*, qu'il dit être deux fois plus actif que celui de *Willstätter* et *Waldschmidt-Leitz*. Il est de nature protéique et diffère en cela du produit de *Waldschmidt-Leitz* et *Reichel*¹⁾, qui, selon leurs observations, ne présente plus les réactions des protéines.

L'enzyme se désactive spontanément en solution aqueuse ou saline, et plus ou moins rapidement selon le stade de la purification. Les sels en général, et surtout le chlorure de sodium, ainsi que plusieurs autres substances (acides aminés, maltose, etc.) ralentissent cette désactivation, mais ne la suppriment jamais. La dialyse contre de l'eau ou des solutions salines provoque une désactivation très rapide que les substances mentionnées ci-dessus ne peuvent empêcher.

Toute désactivation, par contre, est complètement supprimée par l'adjonction d'une solution concentrée de substance ayant traversé la membrane de dialyse. Cet effet stabilisateur est aussi obtenu par addition d'une solution d'enzyme partiellement purifiée (par ex. stade II) qui a été bouillie et filtrée. La dialyse contre cette solution d'enzyme bouillie n'entraîne aucune désactivation. On peut en conclure que la désactivation est due à une dissociation de l'enzyme en un composant dialysable et thermostable (coenzyme), et un composant de nature protéique (apoenzyme). La rétrogradation de la dissociation obtenue par un excès de coenzyme empêcherait donc la désactivation.

Cependant, l'adjonction de coenzyme à de l'enzyme désactivée par dialyse ne rétablit pas l'activité. Il ne s'agit donc pas simplement

¹⁾ *Waldschmidt-Leitz, E., Reichel, M., Z. physiol. Ch. 204, 197 (1932).*

d'une dissociation réversible en coenzyme et apoenzyme. L'enzyme désactivée par dialyse a, en outre, la propriété d'accélérer sensiblement la désactivation de l'enzyme active. Une solution de coenzyme, capable d'empêcher la désactivation de l'enzyme, perd ses propriétés protectrices lorsqu'on lui ajoute une solution d'enzyme dialysée. D'autre part, l'action désactivatrice de l'enzyme dialysée disparaît par adjonction d'un excès de coenzyme. L'enzyme dialysée et la coenzyme, au lieu de se réunir pour reformer l'enzyme primitive, ont donc, au contraire, une action antagoniste.

L'explication la plus simple serait que l'apoenzyme libre soit très peu stable et se transforme en un corps de nature protéique, capable, comme l'apoenzyme non transformée, de fixer la coenzyme, mais en donnant un corps inactif. Il s'établit donc une compétition, car la coenzyme sera sollicitée simultanément par l'apoenzyme et son produit de transformation.

L'enzyme cristallisée en solution aqueuse (voir fig. 3).

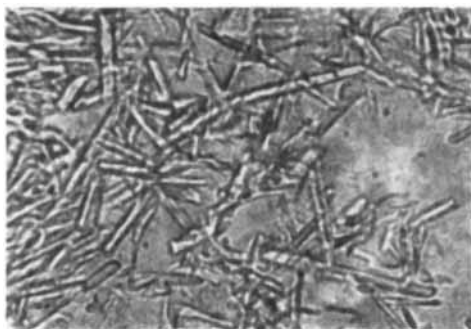


Fig. 3.

α -Amylase cristallisée; grossissement 500 \times .

Partie expérimentale.

Méthodes de dosages.

Dosage de l'activité. On dose colorimétriquement par l'acide 3,5-dinitrosalicylique les groupes réducteurs formés par l'action de l'enzyme sur l'amidon¹). Cette méthode utilisée par Sumner pour le dosage de la saccharase²) a été modifiée et adaptée au dosage des amylases par G. Noelting³).

Réactifs. 1: Solution d'amidon soluble *Zulkowski Merck* à 1%, contenant du NaCl M/150 et tamponnée aux phosphates M/50 à p_H 6,9. En présence de quelques gouttes de toluène, la solution est stable pendant 2 semaines à la chambre froide.

2: Solution contenant 1,0 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique, 20 cm³ de NaOH 2 n et 30 gr. de sel de Seignette, portée à 100 cm³. La solution est stable.

¹) Sumner, J. B., J. Biol. Chem. **65**, 393 (1925); **62**, 287 (1925); Sumner, J. B., Hubbard, R. S., J. Biol. Chem. **56**, 701 (1923).

²) Sumner, J. B., Howell, J. Biol. Chem. **108**, 51 (1935).

³) Pas encore publié.

Dosage. Dans une éprouvette, placée dans un thermostat à 20°, on met 1,0 cm³ d'une solution d'enzyme. Lorsque la solution a pris la température du bain (2 min.) on ajoute 1,0 cm³ de **1** porté préalablement à 20°. On interrompt la réaction après 3 minutes par 2 cm³ de **2**. On plonge l'éprouvette pendant exactement 5 minutes dans de l'eau bouillante, refroidit et dilue par 20 cm³ d'eau. On lit ensuite au photomètre *Pulfrich*, filtre S 53, cuves 20 mm, contre un blanc sans enzyme traité dans les mêmes conditions. L'extinction obtenue est exprimée en maltose hydraté d'après une courbe étalon. Pour une dégradation de l'amidon ne dépassant pas 30% (donnant une extinction 100 log I₀/I < 120 env.) la précision est de ± 1%. Si la dégradation dépasse 20%, il est préférable de répéter le dosage avec une solution d'enzyme plus diluée.

Pour des essais d'orientation, nous avons employé la méthode de *P. Bernfeld et M. Fuld*¹⁾, basée sur les changements de teinte que donne l'amidon à des degrés différents de dégradation avec l'iode. On compare la teinte obtenue avec une échelle colorimétrique établie au moyen de colorants du commerce. La méthode est rapide mais moins précise: précision ± 10%.

Dosage de la substance sèche. Comme on ne peut obtenir des valeurs reproductibles en séchant et pesant directement la solution d'enzyme (et qu'on ne pourrait employer la dialyse pour éliminer les sels), nous avons dosé soit la teneur en azote soit la teneur en tyrosine. Le rapport azote/substance sèche est égal à 6,72 pour l'enzyme purifiée.

En absence de sulfate d'ammonium, l'azote a été dosé par semi-micro *Kjeldahl* (précision ± 1%) et par *Nessler*²⁾ (précision ± 10%). En présence de sulfate d'ammonium, on élimine l'ion ammonium par distillation sur MgO; il semble pourtant préférable, dans ce cas, de doser la tyrosine d'après *Folin et Ciocalteu*.

Dosage de la tyrosine et du tryptophane, d'après *Folin et Ciocalteu*³⁾.

Réactifs. **1**: NaOH à 10%; **2**: Na₂CO₃ à 20%; **3**: CCl₃COOH à 90% poids; **4**: réactif phénolique, on bout dans 700 cm³ d'eau pendant 10 h. à reflux: 100 gr. de WO₄Na₂·2 H₂O; 25 gr. de MoO₄Na₂·2 H₂O; 50 cm³ de H₃PO₄ à 85% et 100 cm³ de HCl conc. On ajoute ensuite 150 gr. de Li₂SO₄ et 50 cm³ d'eau et oxyde la solution verte par addition de quelques gouttes de Br₂. On porte à ébullition, pour éliminer l'excès de Br₂. La solution jaune clair est refroidie et portée à 1000 cm³ par de l'eau. Elle se conserve à l'abri de la lumière.

Dosage. A 1—5 cm³ de la solution d'enzyme se trouvant dans une éprouvette jaugée de 20 cm³, on ajoute 0,5 cm³ de **1**, porte l'éprouvette pendant 30 min. à ébullition, dilue par quelques cm³ d'eau et ajoute 3 cm³ de **2** et 1,0 cm³ de **4**. On complète à 20 cm³, laisse 30 min. à 30—35° et lit au photomètre *Pulfrich*, filtre S 72, cuves 20 mm (éventuellement 10 mm), contre un blanc sans enzyme traité dans les mêmes conditions. On reporte l'extinction sur une courbe étalonée avec de la tyrosine. Jusqu'à 60 γ de tyrosine, le logarithme de l'extinction est proportionnel à la teneur en tyrosine.

En présence de la solution d'enzyme bouillie qui réagit avec le réactif de *Folin*, on procède de la manière suivante: 1—5 cm³ de la solution d'enzyme sont précipités par 1,0 cm³ de **3** et complétés par de l'eau à 9 cm³. On centrifuge, le culot est repris dans 3 cm³ d'eau et neutralisé par **2**. Cette solution est alors dosée comme décrit ci-dessus. Nous exprimons les valeurs obtenues en «tyrosine», ce qui est arbitraire, la réaction n'étant pas spécifique pour ce corps⁴⁾. Mais la comparaison des valeurs nous indique la teneur relative des solutions en matière protéique.

Unité d'activité. Nous exprimons le degré de pureté de l'enzyme par le quotient mgr. maltose par mgr. d'azote (*Kjeldahl*) — respectivement par mgr. de tyrosine.

Dosage de la trypsine: Selon *Willstätter et Waldschmidt-Leitz*⁵⁾, sans adjonction d'entérokinase.

1) Pas encore publié.

2) *Lange*, „Kolorimetrische Analyse“, Verlag Chemie 1941.

3) *Folin, O., Ciocalteu, V.*, J. Biol. Chem. **73**, 627 (1927); *Folin, O., Looney, J. M.*, J. Biol. Chem. **51**, 421 (1922).

4) *Scheiner, E.*, Bioch. Z. **205**, 245 (1929).

5) *Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E.*, Z. physiol. Ch. **161**, 190 (1926).

Dosage des groupes carboxyles des polypeptides et des acides aminés: selon Willstätter et Waldschmidt-Leitz¹).

Dosage de l'azote aminé libre: selon Van Slyke²).

Prescription pour l'isolement de l' α -amylase de pancréas. (Routine-method.)

Eau: distillée sur $\text{Ba}(\text{OH})_2$, réfrigérant d'étain, p_{H} 6,3.

Sulfate d'ammonium puriss. pro analysi *Merk*: solution saturée à 0° et neutralisée à p_{H} 7,0 par NH_4OH (41,4 gr. de sel dans 100 gr. de sol.).

Alcool amylique: puriss. distillé. *Alcool décylrique:* puriss. de la maison *Givaudan*.

Ether: distillé sur Na. *Acétone:* traité pendant 24 heures à froid par 4 gr. de KMnO_4 , 6 gr. de Na_2CO_3 par litre d'acétone, puis distillé sur colonne de fractionnement *Widmer*. ($d_{40}^{25} = 0,793$, soit à 98%.) *Chloroforme:* distillé et gardé sur Na_2CO_3 . *Toluène:* distillé sur carbonate de Pb.

Wofatite M (I.G. Farbenindustrie; peut être remplacé par de l'Amberlite I R—4B analyt. grade de la « Resinous Prod. and Chem. Co. » Philadelphia). 100 gr. ont été brassés pendant 5 heures avec 500 cm³ de solution d'acétate de sodium 2 n. On décante la solution et répète 4 fois l'opération. On lave ensuite avec 15 l. d'eau que l'on fait couler sur la Wofatite pendant 12 heures. Le produit doit être préparé peu avant l'emploi et gardé sous l'eau.

Poudre sèche. 5 kg. de glande brute de pancréas de porc (comme livré par l'abattoir) sont refroidis à 0° 4 à 6 heures après l'abattage. *Toutes les opérations qui suivent se feront entre 0 et 2°.* Le matériel est dégraissé et passé plusieurs fois par une machine à hâcher jusqu'à formation d'un brai assez liquide. Ce brai (environ 2,5 litres) est secoué pendant 4 à 6 heures avec 2,5 litres d'acétone. On centrifuge et répète le traitement 3 fois avec le même volume d'acétone, 2 fois avec de l'acétone-éther (1 : 1) et 2 fois avec de l'éther. Le produit ainsi obtenu est séché pendant 48 heures au vide poussé sur silicagel. On obtient 415 gr. d'une poudre grossière, composée de particules fibrilleuses, stable au moins une année à 2°.

$\frac{1}{6}$ de cette poudre doit être consacré à la préparation de l'enzyme bouillie, et le reste servira à la purification.

Extrait brut. Dans un flacon placé sur une secoueuse lente, on extrait 60 gr. de poudre sèche par 900 cm³ d'acétate de sodium 0,5 n, p_{H} 7,2, en présence de quelques gouttes de toluène et d'alcool décylrique, pendant 48 heures. On centrifuge la suspension pendant 75 min. à 3000 tours/min. Le culot, dont une nouvelle extraction ne donnerait que 10 à 20% d'activité, est rejeté; l'extrait brut (800—870 cm³) contient plus de 80% de la totalité de l'amylase, et 50—80% de la totalité d'azote.

Stade I. 800 cm³ d'extrait brut (p_{H} 6,6) sont dilués par 800 cm³ d'eau et additionnés de 1670 cm³ d'acétone (concentration finale en acétone de la solution³): 50,5%). La solution se trouve dans un bûcher de 5 litres entouré de glace fondante; l'acétone coule en une fine pluie de 4 entonnoirs dont les tubes étirés ont un diamètre de 1 mm. environ à l'extrémité. L'agitateur doit remuer toute la solution et tourne à 90 tours/min. Après l'adjonction de l'acétone, on continue l'agitation pendant 15 min. puis centrifuge. Le culot qui contient la grosse majorité des protéases est rejeté; on rajoute à la solution 1430 cm³ d'acétone (64%) en une heure et centrifuge. La solution qui contient pratiquement tout l'acétate de sodium, est rejetée; le culot actif est dissous dans 800 cm³ d'eau à p_{H} 7. Enrichissement 2,6 fois, rendement en activité 80%.

Stade II. On précipite de la même manière les 800 cm³ du St. I à p_{H} 7 par 860 cm³ d'acétone (51%) et centrifuge. Le culot, qui contient une globuline apparemment homogène en quantité considérable, est rejeté, la solution est additionnée de 1140 cm³ d'acétone

¹) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., B. 54, 2988 (1921).

²) Van Slyke, D. D., B. 43, 3170 (1910); B. 44, 1684 (1911).

³) Dans la suite, la teneur finale d'une solution sera donnée entre parenthèses.

(69%). On centrifuge et rejette la solution. Le culot obtenu sera traité différemment selon qu'on voudra préparer de la solution d'enzyme bouillie ou poursuivre la purification:

a) Pour la production de la solution d'enzyme bouillie, le culot est dissous dans 100 cm³ d'eau et introduit goutte à goutte dans 100 cm³ d'eau maintenue à ébullition. On filtre, lave le gros précipité par un peu d'eau, ramène au p_H 7 avec NaOH et complète la solution à 200 cm³. Cette solution contient une quantité de coenzyme correspondant à une activité amylique de 3500 mgr. maltose par cm³. Gardée à 2° sous une mince couche de toluène, elle est stable.

b) En vue de l'isolement de l'enzyme, le culot est dissous dans 200 cm³ d'eau à p_H 7,0. Enrichissement 2,9 fois, rendement en activité: 80%. Ce stade contient 100 fois moins de trypsine que l'extrait brut.

Stade III. On ajoute d'un seul coup à IIb, sous agitation modérée, 88 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium (0,325 saturation). Après 30 min. on centrifuge. La solution est rejetée, le culot est dissous et porté à 100 cm³ par un volume d'eau mesuré. Connaissant par différence le volume du culot qu'on suppose être à 0,325 saturation, on calcule la teneur en sulfate d'ammonium de la solution complétée à volume connu. Enrichissement 2 fois, rendement en activité 60%.

Stade IV. La solution III est précipitée par la solution de sulfate d'ammonium jusqu'à 0,225 saturation, compte tenu de la teneur primitive en sulfate. On centrifuge après 30 minutes et rejette la solution. Le culot est dissous dans un peu d'eau. On ajoute 25 cm³ de la solution d'enzyme bouillie et complète par de l'eau à 50 cm³. Enrichissement 1,15 fois, rendement en activité 80%. Cette solution contient 6 à 8% de sulfate d'ammonium qui doit être éliminé.

Stade V. On porte la solution IV à p_H 7,9 par NH₄OH 0,1 n avec agitation et on la précipite par de l'acétone (préalablement porté à p_H 8,3 par quelques gouttes d'NH₄OH conc.) jusqu'à une concentration de 55%. On centrifuge, rejette le précipité, ajoute de l'acétone jusqu'à 65% et centrifuge. Le culot est dissous, on ajoute 20 cm³ de la solution de coenzyme et complète à 50 cm³. Enrichissement 1,03 fois, rendement en activité 60%.

Stade VI. La solution V est fortement secouée pendant 10 min. avec 10 cm³ de CHCl₃ et 2,5 cm³ d'alcool amylique. On centrifuge l'émulsion (30 min. à 1 heure à 3000 tours/min.) décante la solution limpide et répète 5 à 6 fois cette opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un très faible voile de protéines coagulées à l'interface eau-chloroforme. Enrichissement 1,2 fois, rendement en activité 90%.

Stade VII. On agite la solution VI pendant 45 min. avec 2,5 gr. de wofatite dont l'excès d'eau est éliminé entre 2 papiers filtres. On décante et répète l'opération. Aucun enrichissement, rendement en activité 100%.

Stade VIII. La solution VII est précipitée par de l'acétone. Après l'apparition du premier trouble (entre 50 et 55%) on centrifuge et ajoute de l'acétone jusqu'à 70%. On centrifuge et dissout le culot dans de l'eau. Enrichissement 1,05 fois, rendement 90%.

Les activités, enrichissements et rendements obtenus sont groupés dans le tableau 3.

Produit sec. Il s'obtient à partir de la solution VIII par congélation rapide (neige carbonique-acétone) et sublimation au vide poussé sur silicagel. Lorsqu'on redissout le produit sec, on ne récupère que 70 à 80% de l'activité primitive; il reste un résidu insoluble. Le produit dissous a le même degré de pureté qu'avant le séchage. C'est cette solution qui a été soumise à l'électrophorèse.

*Analyse*¹⁾ du produit sec, séché encore pendant 4 jours à 80° au vide poussé sur P₂O₅:

2,569 mgr. subst. ont donné 0,348 cm³ d'N₂ à 23°/725 mm
 5,268 mgr. subst. ont donné 2,264 mgr. phosphomolybdate d'NH₄
 4,321 mgr. subst. ont donné 0,000 mgr. BaSO₄
 14,9% N; 0,62% P; 0,0% S;

¹⁾ Effectuée par le Département de microanalyse de l'Ecole Polytechnique de Zurich.

Tableau 3

Stade	1) Activité par cm ³	2) Azote par cm ³	Activité par mgr. N	Enrich. par rap- port au stade précédt.	Enrich. par rap- port à l'extrait brut.	Rendemt. par rap- port au stade précédt.	Rendemt. par rap- port à l'extrait brut.
Extrait brut	1350	7,1	190	—	—	—	—
I	1800	3,5	510	2,63	2,6	80	80
II	3450	2,4	1460	2,9	7,7	80	64
III	4120	1,4	2960	2,03	15,6	60	38
IV	6600	1,9	3400	1,15	18,0	80	30
V	3960	1,1	3500	1,03	18,4	60	18
VI	3560	0,85	4180	1,2	22	90	16,5
VII	3440	0,82	4180	1,0	22	100	16,5
VIII	—	—	4370	1,05	23	90	15,0

Cristallisation de la protéine. Le produit sec est dissous dans 20 fois son poids d'eau, centrifugé, et la solution limpide à p_H 7,0 est additionnée d'acétone jusqu'à 50%. Au bout de 3 ou 4 jours, il y a formation d'une abondante quantité de cristaux. Ceux-ci sont peu solubles dans l'eau ou dans les solutions salines, ils coagulent à la chaleur. Les cristaux ont la même activité par mgr. d'azote que la solution à partir de laquelle ils se forment.

Désactivation et stabilisation de l'enzyme.

Désactivation spontanée. Les solutions d'enzyme sont instables et se désactivent spontanément. L'extrait brut perd :

- à 3°: 10 à 20% d'activité en 1 mois;
- à 18°: 30 à 50% d'activité en 24 heures;
- à 35°: 50% d'activité en 30 min.

Une solution purifiée d'enzyme est encore plus labile. L'enzyme du stade II peut perdre par exemple :

- à 0°: 75% d'activité en 24 heures;
- à 25°: 80% d'activité en 30 ou 45 min.

Cette instabilité varie énormément d'un produit à l'autre.

Désactivation par dialyse. 20 cm³ de solution de stade IIb (activité = 1600 mgr. maltose/cm³) ont été partagés en 4 parties égales. Les résultats se trouvent dans la figure 4.

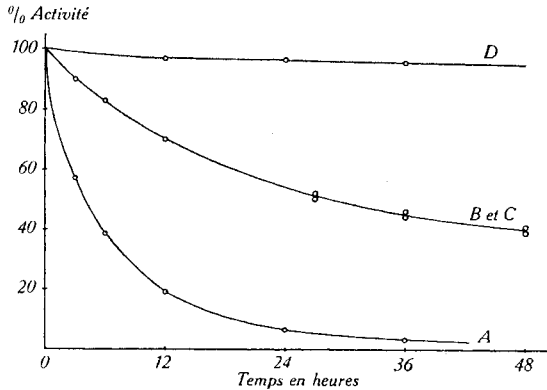


Fig. 4. Désactivation de l'amylase par dialyse (voir texte).

1) Activité exprimée en mgr. maltose.

2) mgr. azote Kjeldahl.

Courbe A: 5 cm³ ont été dialysés dans un sac de «Cellophane» contre 200 fois leur volume d'eau (1000 cm³) à 2°;
 Courbe B: 5 cm³ ont été dilués à 200 fois leur volume (1000 cm³);
 Courbe C: 5 cm³ ont été gardés tels quels;
 Courbe D: 5 cm³ ont été dialysés contre 1 litre de solution contenant 240 cm³ de solution d'enzyme bouillie (concentration de coenzyme double de celle de l'amylase).

Des expériences analogues ont été effectuées avec tous les stades. Une dialyse contre des sels donne les mêmes résultats. Le contact avec la «Cellophane» n'a aucun effet sur l'enzyme.

Désactivation par adjonction de l'enzyme dialysée. L'enzyme désactivée par dialyse accélère la désactivation spontanée de l'enzyme active (voir figure 5).

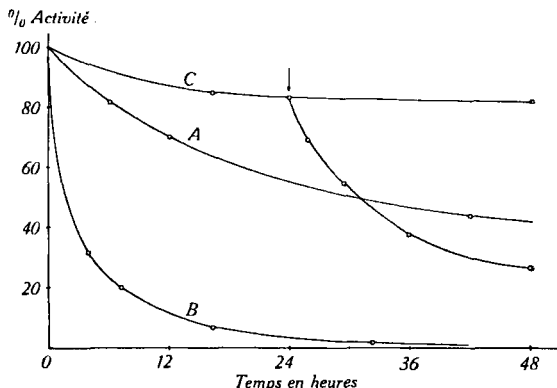


Fig. 5.

Effet antagoniste de la désactivation et de la stabilisation de l' α -amylase.

Courbe A: 10 cm³ de sol. d'enzyme Stade II, 20 cm³ d'eau;

Courbe B: 10 cm³ sol. enzyme Stade II, 10 cm³ enzyme dialysée, 10 cm³ d'eau;

Courbe C: 10 cm³ sol. enzyme Stade II, 10 cm³ enzyme dialysée, 10 cm³ de coenzyme (liqueur extérieure de dialyse);

↓ Adjonction de 5 cm³ d'enzyme dialysée à une prise de 15 cm³ de la solution C.

L'enzyme stabilisée par l'adjonction de coenzyme se désactive après adjonction de l'apoenzyme transformée.

Nous remercions le Dr. *Wiedemann* de la «Sandoz A.G.» d'avoir bien voulu effectuer l'électrophorèse.

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

Nous remercions M. le Prof. *A. Stoll* pour l'intérêt amical qu'il a porté à nos travaux.

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