

SUMMARY.

1. The comparative degradation of amylopectin by potato phosphorylase and wheat- β -amylase have been performed.

2. After 3 successive arsenolyses, the same limit of degradation was obtained as with β -amylase. Each enzymatic attack was followed first by a dialysis to eliminate the glucose formed which acts as a competitive inhibitor, then by rejuvenation of the dialysed dextrin. The dextrans obtained were again attacked by phosphorylase and β -amylase until a final limit was attained. In the case of phosphorylase the reaction rate diminishes considerably as the degradation proceeds indicating a decrease of affinity towards the substrate.

3. Identical results have been obtained on an amylopectin partially degraded by β -amylase.

4. By unit of weight, potato phosphorylase degrades (arsenolysis) waxy maïs amylopectin 1,100 times less rapidly than crystalline sweet potato β -amylase. Its action on *Zulkowski's* soluble starch is 900 times slower.

5. A waxy maïs limit β -dextrin may serve as a starter for potato phosphorylase. The initial speed of reaction however is 100 times slower than for the same weight of intact amylopectin. This also shows that the affinity of the enzyme depends largely on the chain length of the outer branches of the polysaccharide.

6. Results obtained indicate that the degradation pattern of potato phosphorylase differs considerably from that of muscle phosphorylase.

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

32. Propriétés de la β -amylase de malt. Sur les enzymes amylolytiques 21¹⁾

par A. Piguet et Ed. H. Fischer.

(14 XII 51)

Dans un précédent travail²⁾, nous avons décrit la purification et la cristallisation de la β -amylase de malt. Nous décrivons ici les propriétés de cet enzyme.

Propriétés de l'enzyme pur.

Nature protéique: l'enzyme donne les réactions habituelles des protéines. Sa teneur en azote (*Kjeldahl*) est de 14,1%. Il est exempt de sucre ou de polysaccharide²⁾.

¹⁾ Précédente communication: *Helv.* **35**, 247 (1952).

²⁾ *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & A. Piguet, Helv.* **34**, 316 (1951).

Degré de pureté: l'enzyme cristallisé a un degré de pureté de 1650 mg maltose/mg d'azote *Kjeldahl*.

*Rapport pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène*¹⁾: le rapport PS/PD de la β -amylase de malt cristallisée a été trouvé égal à 62 ± 2 (61 pour la β -amylase de sweet potato cristallisée par *Balls* et coll.²⁾).

Activité en fonction du pH: l'enzyme est actif entre les pH 2,5 et 9,1, avec une zone optima comprise entre pH 4,8 et pH 5,7. Le maximum se trouve à pH 5,2 entre 0° et 50° (fig. 1).

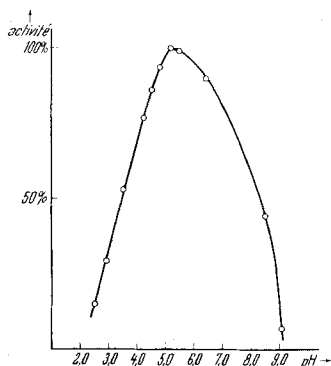


Fig. 1.

Activité de la β -amylase de malt en fonction du pH.

Activité en fonction de la température: l'optimum d'action de la β -amylase de malt se trouve vers 55° (fig. 2). Au delà de cette température, l'enzyme est très rapidement et irréversiblement détruit. Comme pour l' α -amylase de malt³⁾, nous avons exprimé la vitesse de réaction v par la quantité de maltose libérée par l'enzyme en 1 min. dans une solution d'amidon *Zulkowski* à 0,5% et pH 4,8.

$$v = \text{mg maltose/min.}$$

Nous avons observé une variation brusque de la vitesse de réaction à la température de 20°. Les coefficients de température ont les valeurs suivantes:

2,86 entre 0° et 10°	1,27 entre 20° et 30°
2,95 entre 10° et 20°	1,43 entre 30° et 40°
1,40 entre 40° et 50°	

En calculant l'énergie d'activation selon la formule

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

¹⁾ *P. Bernfeld & M. Fuld*, *Helv.* **31**, 1420 (1948).

²⁾ *A. K. Balls, R. R. Thomson & M. K. Walden*, *J. Biol. Chem.* **163**, 571 (1946); **173**, 9 (1948).

³⁾ *Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach*, *Helv.* **34**, 325 (1951).

nous avons constaté que l'enzyme possédait deux énergies d'activation nettement différentes (fig. 3): la première de 16,200 cal/mole pour les températures entre 0° et 20°; la seconde de 5,530 cal/mole pour les températures entre 20° et 55°. Rappelons que l' α -amylase de malt a une chaleur d'activation de 7,050 cal/mole entre 0° et 40°¹⁾ et que Sizer²⁾ donne pour un mélange d' α -et de β -amylase de malt la valeur intermédiaire de 12,300.

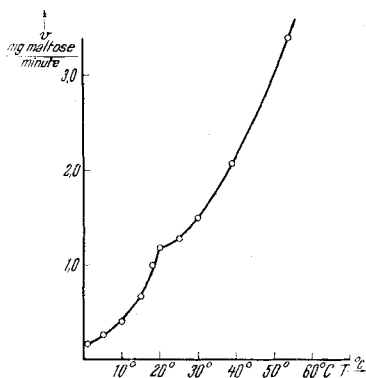


Fig. 2.

Activité de la β -amylase de malt en fonction de la température à pH 4,8.

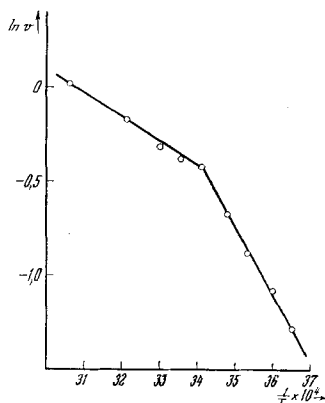


Fig. 3.

Logarithme de la vitesse de réaction de la β -amylase de malt en fonction de l'inverse de la température absolue.

Stabilité: les solutions aqueuses de la β -amylase de malt sont stables. A une température de 25°, aucune perte d'activité n'a été observée entre les pH 4,5 et 8,0 (fig. 4). L'enzyme cristallisé suspendu dans une solution de sulfate d'ammonium à 0,5 sat. se conserve parfaitement à froid pendant des mois.

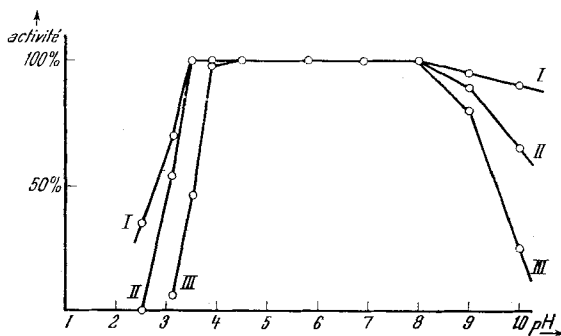


Fig. 4.

Stabilité de la β -amylase de malt à 25° en fonction du pH.
I après 10'. II après 1 h. III après 20 h.

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

²⁾ I. W. Sizer, *Adv. in Enzymol.* **3**, 49 (1943).

Activation et inhibition: l'enzyme ne réclame pour son activité ni la présence de l'ion Cl^- , nécessaire aux α -amylases animales, ni celle du calcium, indispensable à l' α -amylase de malt¹⁾. L'activité est conservée après dialyse prolongée à froid contre de l'eau distillée. L'action du «complexeon II» (acide ethylènediamine-tétracarboxylique) ne modifie en rien l'activité de la β -amylase, alors qu'il désactive complètement l' α -amylase de malt en fixant les ions Ca^{++} en solution²⁾. Par contre, la β -amylase, qui contient des groupes $-\text{SH}$ (réaction au nitroprussiate) est très sensible à l'action des métaux lourds. Le cuivre et le mercure la désactivent totalement et instantanément à des concentrations très faibles (0,0001-m.). Nous n'avons pu en aucun cas réactiver l'enzyme au moyen de l'hydrogène sulfuré.

Solubilité: la β -amylase de malt est très soluble dans l'eau. L'enzyme ne peut être cristallisé à partir de sa solution aqueuse que par addition de sels (sulfate d'ammonium). La solubilité dans une solution de sulfate d'ammonium à 0,24 sat. est d'environ 45 mg d'enzyme/cm³.

Mobilité et point isoélectrique: la fig. 5 montre la variation de la mobilité électrophorétique en fonction du pH. Le point isoélectrique est situé à $\text{pH } 6,1 \pm 0,1$.

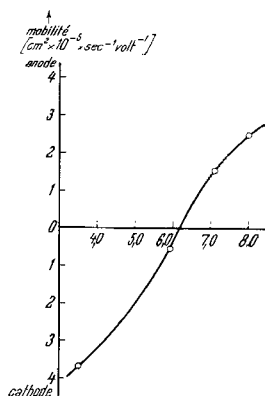


Fig. 5.

Mobilités électrophorétiques de la β -amylase de malt en fonction du pH.

Spectre d'absorption: le spectre d'absorption de la β -amylase de malt dans l'ultra-violet présente un maximum à 280 $m\mu$, comme les spectres de toutes les autres amylases.

Action sur un maltoside: une solution d' α -phénylmaltoside soumise à l'attaque de la β -amylase de malt pendant 67 h. à 20° n'a présenté aucune augmentation du pouvoir réducteur. Avec Helferich³⁾, nous pouvons en conclure que la β -amylase de malt n'attaque pas ce maltoside.

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

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

³⁾ B. Helferich & S. R. Petersen, B **68**, 790 (1935). Nous remercions vivement Monsieur le Prof. B. F. Helferich qui nous a fourni l' α -phénylmaltoside.

Partie expérimentale.

Dosage d'activité: l'activité de la β -amylase de malt est mesurée par la méthode colorimétrique au moyen de l'acide dinitro-3,5-salicylique¹⁾.

Degré de pureté: il est exprimé par l'activité rapportée à une quantité d'enzyme équivalent à 1 mg d'azote protéique (*Kjeldahl*).

Rapport PS/PD: mesuré selon *Bernfeld & Fuld*²⁾.

Activité en fonction du pH: elle est mesurée de la manière habituelle, mais avec des solutions d'amidon *Zulkowski* tamponnées à différents pH (tampons au lactate (pH 2,5 et 2,9), à l'acétate (pH 4,2, 4,6, 4,8, 5,2 et 5,5), et aux phosphates (pH 6,4, 8,6 et 9,1).

Activité en fonction de la température: les mesures ont été effectuées à pH 4,8 comme pour un dosage ordinaire, mais on a pris soin d'amener préalablement les solutions de substrat et d'enzyme à la température du dosage. Les temps ont été choisis pour avoir toujours le même pourcentage approximatif de dégradation du substrat.

Influence des ions Cl⁻ et Ca⁺⁺: 1 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 100 mg maltose/cm³, dilué à 100 cm³ dans une solution de NaCl 0,1-m. n'a montré aucune augmentation de l'activité. 1 cm³ de la solution ainsi diluée a donné au colorimètre une extinction correspondant à une activité de 1,0 mg maltose. 10 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 100 mg maltose/cm³ sont additionnés de 10 cm³ d'une solution de complexe II 0,1-m. à pH 6. Après 24 h., aucune perte d'activité n'a été observée.

Action des métaux lourds: deux prises de 10 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 100 mg maltose/cm³ sont additionnées respectivement de 1 cm³ d'une solution de CuSO₄ 0,001-m. et de 1 cm³ d'une solution de HgCl₂ 0,001-m. Dans les deux cas, il y a désactivation totale et immédiate, accompagnée de floculation. L'action prolongée de l'hydrogène sulfuré n'amène pas de réactivation.

Stabilité en fonction du pH: des solutions d'enzyme ont été tamponnées aux pH 2,5, 3,1 et 3,5 par des tampons au lactate, aux pH 3,9, 4,5 et 5,8 par des tampons à l'acétate, aux pH 6,9 et 8,0 par des tampons aux phosphates, et aux pH 9,0 et 10,0 par des tampons au glycocole. Dans chaque cas, la quantité d'enzyme correspondait à une activité de 15 mg maltose/cm³ et la concentration en tampon était de 0,05-m. Les dosages ont été effectués après 10 min., 60 min. et 20 h., en diluant 1 cm³ d'une solution d'enzyme dans 10 cm³ de tampon à l'acétate 0,1-m. à pH 5,0 et en mesurant l'activité de la solution ainsi obtenue.

Action sur l' α -phénylmaltoside: substrat: 9 cm³ de solution de phénylmaltoside (10 mg/cm³) + 1 cm³ de tampon à l'acétate à pH 4,8; enzyme: solution de β -amylase cristallisée d'une activité de 52 mg maltose/cm³. L'essai a été effectué dans un thermostat à 20° en ajoutant 10 cm³ de la solution de substrat à 10 cm³ de la solution d'enzyme. Des prises de 2 cm³ ont été prélevées après 3 h., 6 h., 17 h., 24 h., et 67 h., additionnées de 2 cm³ de solution d'acide dinitro-3,5-salicylique et dosées au colorimètre. L'extinction a été nulle dans tous les cas.

Nous remercions vivement M. le Prof. *K. H. Meyer* pour les conseils et l'intérêt qu'il a porté à ce travail, ainsi que le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* et la *Rockefeller Foundation* pour l'aide qu'ils nous ont accordée.

SUMMARY.

Some properties of crystalline malt β -amylase are described.

The pure enzyme has a specific activity of 1650 mg maltose/mg nitrogen, and a saccharogenic to dextrinogenic ratio of 62. Its activity which is independent of any ions shows a maximum at pH 5.2.

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

²⁾ *P. Bernfeld & M. Fuld*, *Helv.* **31**, 1420 (1948).

The activation energy of the enzyme presents a sharp break at 20°. Values of 16200 cal/mole between 0° and 20° and 5530 cal/mole between 20° and 55° have been found.

The enzyme is an albumine, very soluble in water where it can be stocked in the cold for long periods without activity losses. Contrarily to crystalline malt α -amylase, it is relatively stable towards low pH but rapidly destroyed at high temperatures. It is totally and irreversibly destroyed by the salts of heavy metals.

The electrophoretic mobility curve of crystalline malt β -amylase has been determined; its isoelectric point lies at pH 6.1 ± 0.1 . As for the other crystalline amylases, its absorption spectrum shows a maximum at 280 m μ .

The enzyme has no action on the α -phenylmaltoside.

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

33. La méthanolyse de l'acide hyaluronique méthylé.

Recherches sur l'acide hyaluronique et les substances apparentées V¹)

par R. W. Jeanloz.

(10 XII 51)

*Meyer, Fellig & Fischer*²) ont proposé récemment une structure de l'acide hyaluronique quelque peu différente de celle que nous avons présentée³). Comme nous, ils ont observé que l'acide hyaluronique n'était pratiquement pas oxydé par l'ion periodate, et ils en ont conclu que le reste glucuronique était lié au reste glucosaminique par les positions 1—3, alors qu'une liaison 1—6 était exclue entre le reste glucosaminique et le reste glucuronique. Pour établir la nature de cette dernière liaison, ils ont effectué l'oxydation, par l'ion periodate, du produit de scission méthanolytique de l'acide hyaluronique méthylé. Ils en ont déduit que seule une liaison 1—4 est possible, alors que nos résultats s'accordaient mieux avec une liaison 1—3⁴). Les données qui

¹) 4me communication, R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **190**, 537 (1951). Cette communication porte le N°. 126 des communications du Robert W. Lovett Memorial for the Study of Crippling Disease, Harvard Medical School.

²) K. H. Meyer & J. Fellig, Exper. **6**, 186 (1950); K. H. Meyer, J. Fellig & Ed. H. Fischer, Helv. **34**, 939 (1951).

³) R. Jeanloz, Exper. **6**, 52 (1950); R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **190**, 537 (1951).

⁴) Meyer, Fellig & Fischer (loc. cit. p. 944) ont écrit que nous avons basé notre choix entre ces deux possibilités, sur une comparaison avec l'oxydation par le periodate de l'acétylglucosamine. Cette interprétation de notre article³) est erronée; nous avons basé notre choix sur une comparaison de l'oxydation par le periodate de l'acide hyaluronique désacétylé avec l'oxydation du chitosane et de l' α -méthylglucosaminide.