

## 66. Purification et cristallisation de l' $\alpha$ -amylase de *B. subtilis* (souche *Takamine*).

### Sur les enzymes amylolytiques 23<sup>1)</sup>

par J. Fellig<sup>2)</sup>, Eric A. Stein<sup>3) 3a)</sup> et Ed. H. Fischer<sup>3a)</sup>.

(1 II 57)

L'étude comparative des  $\alpha$ -amylases de malt<sup>4)</sup>, de champignon inférieur<sup>5)</sup>, de bactérie<sup>6)</sup>, de pancréas de porc<sup>7)</sup>, de salive<sup>8)</sup> et de pancréas humains<sup>9)</sup> nous a montré que la plupart de leurs propriétés varient régulièrement d'une espèce à l'autre. Par contre, dans une espèce donnée, les caractères de ces enzymes semblent rester remarquablement constants ( $\alpha$ -amylase de porc, amylases humaines). Aussi nous a-t-il paru intéressant de vérifier s'il en était de même chez les bactéries, où l'on trouve, dans une même espèce, toute une variété d'individus pouvant différer considérablement par leurs caractères biologiques et génétiques.

En 1947, Kurt H. Meyer, M. Fuld & P. Bernfeld<sup>6)</sup> annonçaient la cristallisation de l' $\alpha$ -amylase de *B. subtilis* (souche *Kalle*)<sup>10)</sup> à partir d'un produit commercial<sup>11)</sup>. La méthode utilisait entre autres deux précipitations en milieu fortement acide, opérations dangereuses qui ne pouvaient être effectuées que sur un matériel contenant des colloïdes protecteurs de l'enzyme. La maison *Kalle* ayant par la suite modifié

<sup>1)</sup> Précédente communication: Helv. **36**, 1924 (1953).

<sup>2)</sup> Adresse actuelle: Division of Biochemistry, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.

<sup>3)</sup> Boursier de la *Fondation pour Bourses dans le domaine de la Chimie*.

<sup>3a)</sup> Adresse actuelle: Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.

<sup>4)</sup> S. Schwimmer & A. K. Balls, J. biol. Chemistry **176**, 465 (1948); **179**, 1063 (1949); Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, Helv. **34**, 325 (1951).

<sup>5)</sup> Ed. H. Fischer & R. de Montmollin, Helv. **34**, 1987, 1994 (1951).

<sup>6)</sup> Kurt H. Meyer, M. Fuld & P. Bernfeld, Experientia **3**, 411 (1947).

<sup>7)</sup> Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv. **30**, 64 (1947); Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv. **31**, 1831, 1839 (1948).

<sup>8)</sup> Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer, A. Staub & P. Bernfeld, Helv. **31**, 2158 (1948); P. Bernfeld, A. Staub & Ed. H. Fischer, Helv. **31**, 2165 (1948).

<sup>9)</sup> Ed. H. Fischer, F. Duckert & P. Bernfeld, Helv. **33**, 1060 (1950); P. Bernfeld, F. Duckert & Ed. H. Fischer, Helv. **33**, 1064 (1950).

<sup>10)</sup> Par souche «*Kalle*» ou «*Takamine*», nous désignons l'origine des bactéries à partir desquelles les concentrés d'amylase ont été obtenus, sans impliquer pour cela qu'il s'agisse d'une souche génétiquement définie de *B. subtilis*. En fait, comme il s'agit de produits commerciaux, nous n'avons pu obtenir aucune indication nous permettant de caractériser ces organismes de façon plus précise.

<sup>11)</sup> «*Biolase*», *Kalle & Co.*, Wiesbaden, Allemagne.

la préparation de son produit, il ne fut plus possible de répéter la purification décrite<sup>12)</sup>.

C'est la raison pour laquelle nous avons repris la purification de l'amylase bactérienne, à partir d'un matériel différent de celui utilisé par Meyer et coll. Afin que cette purification fût le moins possible influencée par les variations auxquelles sont toujours sujets les extraits commerciaux, nous nous sommes efforcés d'éviter tout traitement drastique.

Nous rapportons dans ce premier travail la cristallisation de l' $\alpha$ -amylase de *B. subtilis* (souche *Takamine*)<sup>13)</sup>; dans le travail qui suit, nous étudions les propriétés de cet enzyme en les comparant à celles de l' $\alpha$ -amylase de *B. subtilis* (souche *Kalle*).

*Purification*<sup>13a)</sup>: Comme dans le cas de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae*<sup>5)</sup>, cette purification n'utilise en principe que des méthodes habituelles: fractionnement au sulfate d'ammonium, «mixed salt» précipitation, dialyse et précipitation acétonique précédant la cristallisation. Cependant, une opération supplémentaire a été introduite afin de débarrasser l'enzyme d'impuretés colorées.

En effet, les extraits bruts que l'on obtient à partir de concentrés bactériens commerciaux sont brun-noir et les substances responsables de cette coloration (produits résultant de l'oxydation de polyphénols ou d'une réaction de *Maillard* entre hydrates de carbone et composés aminés) ne peuvent être éliminées par des précipitations fractionnées successives. Ces impuretés n'empêchent cependant nullement la cristallisation de l'enzyme, mais la solution que l'on obtient après redissolution des cristaux est tellement colorée qu'elle ne peut être analysée par aucune des méthodes utilisant les procédés optiques habituels. Des dialyses ou des cristallisations répétées sont insuffisantes pour éliminer cette coloration dont l'intensité varie d'un produit à l'autre et augmente en général avec le temps.

Nous avons cherché à décolorer l'enzyme par différentes méthodes. De bons résultats ont été obtenus au moyen de chromatographies effectuées sur divers adsorbants. Par exemple, en passant des solutions diluées d'enzyme sur de la terre d'infusoires en présence d'acétate de calcium, on peut parfaitement séparer l'amylase — qui migre moins vite — des impuretés colorées. Cependant, la dilution à laquelle il faut travailler est telle que cette opération n'est pas réalisable pour les quantités mises en jeu lors d'une purification habituelle.

Nous avons pourtant observé que l'adsorption du produit coloré augmente proportionnellement à la concentration en ions  $\text{Ca}^{++}$  présents. Ceci nous a conduits à examiner le pouvoir décolorant des sels insolubles

<sup>12)</sup> G. C. Gibbons, travail non publié.

<sup>13)</sup> «Bacterial Amylase Concentrate», *Takamine Labs., Inc.*, Clifton, N. J., U.S.A. Nous remercions la maison *Takamine* d'avoir gracieusement mis ce produit à notre disposition.

<sup>13a)</sup> *Ed. H. Fischer & Eric A. Stein*, Arch. Sci. 7, 131 (1954).

de métaux alcalino-terreux et de fait, nous avons trouvé que les substances colorées sont fortement et sélectivement adsorbées sur les borates, oxalates, phosphates et sulfates de Ca, Sr et Ba. Les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide de sulfate de baryum que l'on forme directement dans la solution d'enzyme à décolorer.

Le rendement en amylose de cette opération extrêmement simple<sup>14</sup>), et qui peut se faire sur de grandes quantités d'enzyme, est de l'ordre de 85 %, pour une décoloration de plus de 90 %. Ce qui reste des impuretés peut être ensuite éliminé par des recristallisations de l'enzyme.

Une fois décolorée, l'amylose est considérablement moins soluble, ce qui facilite beaucoup sa cristallisation. Les cristaux que l'on obtient sont nacrés et parfaitement incolores. D'aspect variable, ils se présentent tantôt sous la forme d'aiguilles effilées plus ou moins longues, tantôt sous celle de prismes allongés terminés en dièdres.

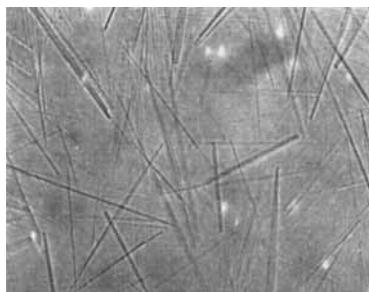


Fig. 1.

Cristaux d' $\alpha$ -amylose de *B. subtilis* (souche *Takamine*), grossissement 150  $\times$ .

*Rendement de la purification:* A partir de 60 g de poudre de départ dont on peut extraire environ 6 millions d'unités d'amylose<sup>15</sup>), on obtient plus de 1 g d'enzyme cristallisé, avec un rendement en activité de l'ordre de 40 %. Après trois cristallisations, l'activité spécifique des eaux-mères atteint celle des cristaux (environ 12 000 unités par mg d'azote), confirmant que le produit cristallisé est bien l'amylose.

*Tests de pureté:* L' $\alpha$ -amylose de *B. subtilis* (souche *Takamine*) a été soumise à l'analyse électrophorétique à pH 5,52 (tampon acétate), 6,80 (tampon phosphate) et 8,55 (tampon véronal-acétate), à une force ionique de  $\mu = 0,1$ . Dans les 3 cas, on obtient le diagramme d'une substance parfaitement homogène.

<sup>14</sup>) Depuis lors, nous avons pu utiliser avec succès cette méthode de décoloration par le BaSO<sub>4</sub> pour la purification d'autres enzymes bactériens ou fongiques (*B. subtilis*, souche *Kalle* – Takadiastase – Chymotrypsine d'*Erythromyces* – protéase de streptocoque – etc.).

<sup>15</sup>) L'unité d' $\alpha$ -amylose est la quantité d'enzyme qui libère 1 mg de «maltose» en 3 min, à 25°, pH 6,0 (tampon glycérophosphate) à partir d'une solution à 1 % d'amidon soluble («Noredux», *Siegfried A.G.*, Zofingue). Les sucres réducteurs sont dosés d'après la méthode colorimétrique à l'ac. dinitro-3,5-salicylique (*G. Noelling & P. Bernfeld, Helv. 31, 286 (1948)*).

Les ultracentrifugations, effectuées dans divers tampons et à 5 concentrations d'enzyme variant de 0,2 à 2 %, ont confirmé la pureté du produit. Les mobilités électrophorétiques et la constante de sédimentation sont rapportées dans la communication suivante.

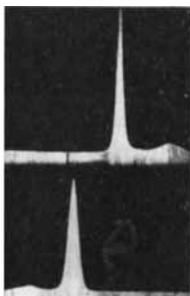


Fig. 2.

Electrophorèse de l' $\alpha$ -amylase de *B. subtilis* (souche Takamine) recristallisée<sup>16</sup>.

Tampon véronal-acétate pH = 8,55,  $\mu$  = 0,1; t = 210 min. Champ électrique: 3,23 volts/cm.

Appareil *Spinco*, modèle H.

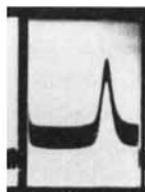


Fig. 3.

Ultracentrifugation de l' $\alpha$ -amylase de *B. subtilis* (souche Takamine) recristallisée<sup>16</sup>.

Solution d'enzyme à 2% dans un tampon véronal-acétate, pH = 8,55 à 20°; t = 44 min, à 59780 t/min.

Ultracentrifugeuse *Spinco*, modèle E.

#### Description des opérations.

<sup>1°</sup> *Réactifs*. A. Solution de sulfate d'ammonium (SA) *pro anal.* saturée à 0° (41,5 g/100 g de solution, soit 3,875-m.), contenant 0,5 g/l d'acétate de Ca; elle est ajustée à pH 5,0 par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. — B. Solution de NaCl saturée à 0° (26,28 g/100 g de solution). — C. Solution 0,5-m. d'acétate de Ba, pH 7,0. — D. Solution 0,4-m. de sulfate d'ammonium, pH 7,0 (NH<sub>4</sub>OH). — E. « Bacterial Amylase Concentrate » de Takamine Labs., Clifton, N. J., U. S. A. Cette poudre est stable lorsqu'elle est conservée à froid, à l'abri de l'humidité.

Toutes les opérations doivent se faire entre 0° et 5°. Centrifugations: 40 min à 15 000 t/min (30 000 g). Agitation: 200 t/min maintenue 15 min après la fin de chaque précipitation.

<sup>2°</sup> *Purification de l' $\alpha$ -amylase de B. subtilis.* — *Extraction*: 60 g de « Bacterial Concentrate » E sont suspendus dans 300 cm<sup>3</sup> d'acétate de Na m/50, contenant 0,25 g/l de BRIJ (tensio-actif non-ionique de l'Atlas Powder Co., Wilmington, Del., U.S.A.), additionnés de 5 à 10 gouttes de décanol; le pH de cette suspension (env. 7) est amené à 8,2 par environ 10 cm<sup>3</sup> de NaOH-m. L'extrait est soumis à une agitation douce, à froid, pendant 2 h, puis centrifugé. Les culots sont rejetés et l'extrait brut, brun-noir, est ajusté à pH 5,0 par environ 15 cm<sup>3</sup> d'acide acétique m., puis porté à 320 cm<sup>3</sup> par de l'eau distillée.

*Fractionnement au sulfate d'ammonium saturé (SAS)*: Les 320 cm<sup>3</sup> de l'extrait brut sont précipités par 160 cm<sup>3</sup> de SAS (sol. A) (0,33 sat.)<sup>17</sup> ajoutés en un fin filet sous agitation efficace. Après 15 min, on centrifuge<sup>18</sup>, rejette les culots (env. 10 cm<sup>3</sup>) et précipite

<sup>16</sup> Ce produit a été purifié en présence de diisopropyl-fluorophosphonate afin d'éviter une dégradation protéolytique de l'enzyme (voir communication suivante).

<sup>17</sup> Les chiffres entre parenthèses indiquent en fractions de la saturation à 0°, les teneurs finales en sulfate d'ammonium (saturation = 1).

<sup>18</sup> Selon les lots de matériel de départ, la quantité de protéine qui précipite à ce stade est parfois minime. Dans ce cas, on peut supprimer cette centrifugation et précipiter directement la solution d'enzyme en l'amenant d'un coup à 0,5 saturation en SA.

la liqueur surnageante par 160 cm<sup>3</sup> de SAS (0,5 sat.). On centrifuge à nouveau, rejette la liqueur surnageante et dissout les culots dans une quantité mesurée d'eau (afin de déterminer leur volume — env. 20 cm<sup>3</sup> — ce qui permettra de calculer leur teneur en sulfate d'ammonium). Cette solution est enfin portée à 120 cm<sup>3</sup> <sup>19)</sup>.

«*Mixed-salt*» *précipitation*: Aux 120 cm<sup>3</sup> de la solution précédente on ajoute 120 cm<sup>3</sup> de la solution B, ajuste le pH à 5,0, puis précipite l'enzyme par env. 150 cm<sup>3</sup> de SAS afin d'obtenir une teneur finale en sulfate d'ammonium de 0,4 sat. (en tenant compte du SA provenant du stade précédent). On centrifuge, rejette la liqueur surnageante, dissout les culots (env. 18 cm<sup>3</sup>) et les porte à 80 cm<sup>3</sup>. Cette solution est dialysée pendant environ 12 h contre 100 à 200 volumes d'acétate de Ca m/350 ajusté à pH 7,5 par NH<sub>4</sub>OH.

*Décoloration*: La solution dialysée est portée à 200 cm<sup>3</sup> avec de l'eau distillée et ajustée à pH 6,8—7,0. En procédant comme pour une précipitation au SAS, on ajoute 200 cm<sup>3</sup> de C suivi d'un même volume de D<sup>20)</sup> puis centrifuge afin d'éliminer le BaSO<sub>4</sub> formé; l'excès d'ions Ba<sup>++</sup> (0,02 mole) est indispensable à une bonne adsorption des matières colorées sur le BaSO<sub>4</sub>, mais, en vue de la cristallisation, il doit être éliminé par une dialyse d'environ 12 h. Celle-ci s'effectue contre 20 volumes d'eau (ajustée à pH 7,5 par NH<sub>4</sub>OH) auxquels on ajoute 40 cm<sup>3</sup> d'Amberlite IR-120, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> maintenus en suspension à l'aide d'un agitateur. De plus, de l'acétate de Na est ajouté à la solution d'enzyme jusqu'à une concentration finale de 0,02-m. environ.

*Cristallisation*: On ajoute 1 g/l d'acétate de Ca à la solution dialysée, ajuste son pH à 6,8 et la précipite d'un seul coup (agitation: 200 t/min) par 2,5 volumes d'acétone préalablement refroidie à -20°. Après 15 min, on centrifuge (2000 t/min; 15 min) et égoutte soigneusement les culots en tenant les tubes renversés. On ajoute ensuite, goutte à goutte, de l'eau aux culots, tout en les triturant, afin de les dissoudre dans un volume minimum (30 à 50 cm<sup>3</sup>). La solution légèrement trouble ou opalescente que l'on obtient d'abord est soumise pendant quelques min à un courant d'air, afin de chasser l'acétone en excès. Après une dernière centrifugation pour éliminer les traces de BaSO<sub>4</sub>, la solution est abandonnée sur une secouaise lente en présence de quelques gouttes de toluène. La cristallisation débute après quelques heures déjà.

*Recristallisation*: Après une à deux semaines, les cristaux sont centrifugés, rapidement lavés dans 2 à 3 volumes d'une solution glacée d'acétate de Ca 0,01-m. et recentrifugés. On suspend ensuite le culot lavé dans 3 à 5 volumes de NH<sub>4</sub>OH 0,1-m., agite la suspension jusqu'à dissolution totale (1 à 3 h), centrifuge et ramène prudemment le pH à 6,8 au moyen de CH<sub>3</sub>COOH 0,2-m. (toluène!). L'enzyme est recristallisé en présence d'environ 2 mg/cm<sup>3</sup> d'acétate de Ca. Les solutions purifiées peuvent être lyophilisées.

Nous adressons une pensée reconnaissante à la mémoire du Prof. Kurt H. Meyer qui a toujours témoigné un intérêt bienveillant à nos travaux.

L'un de nous (E. A. S.) remercie très vivement la *Fondation pour Bourses dans le domaine de la Chimie* pour l'appui qu'elle lui a accordé.

Nous remercions Mlle. Olga Dupont, M. Roger Wade et M. Wolf Hebenstreit de leur précieuse collaboration.

Ce travail a été effectué avec l'appui du *Fonds pour l'Encouragement des Recherches Scientifiques* (Berne), de la *Fondation Rockefeller* (New York) et de l'*Initiative 171* de l'État de Washington (U.S.A.).

<sup>19)</sup> A ce stade, l'enzyme est déjà assez pur qu'il soit possible de le cristalliser, dans des conditions difficiles il est vrai.

<sup>20)</sup> Les quantités indiquées de BaSO<sub>4</sub> donnent en général des résultats satisfaisants. Néanmoins, comme l'intensité de la coloration peut varier d'un échantillon à l'autre, il est parfois avantageux de déterminer rapidement sur des prises de 1 ou 2 cm<sup>3</sup>, quelles sont les quantités optima à mettre en jeu. Pour certains lots de matériel de départ particulièrement colorés, il faut augmenter de 50 à 100% la dilution de la solution d'enzyme et accroître proportionnellement les quantités d'acétate de baryum et de sulfate d'ammonium.

## SUMMARY.

The purification and crystallization of an  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis*, Strain *Takamine*, are described.

In addition to ammonium sulfate fractionation, "mixed-salt" precipitation, dialysis and acetone precipitation, the procedure includes the adsorption of brown pigments on freshly precipitated  $\text{BaSO}_4$ .

One gram of crystalline amylase was obtained from 60 g of crude powder, the total yield of activity being about 40%. After three crystallizations, the enzyme gave the electrophoretic and ultracentrifugal pattern of a homogeneous compound.

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

et

Department of Biochemistry,  
University of Washington School of Medicine,  
Seattle, Washington (U. S. A.).

## 67. Propriétés de deux $\alpha$ -amylases de *B. subtilis*.

### Sur les enzymes amylolytiques 24<sup>1)</sup>

par R. Menzi<sup>2)</sup>, Eric A. Stein<sup>3)</sup> et Ed. H. Fischer<sup>4)</sup>.

(I II 57)

Dans le cadre de nos travaux sur les enzymes amylolytiques, nous avons entrepris une étude comparative de la spécificité de structure des  $\alpha$ -amylases selon leur origine. Le présent travail fut suscité par les divergences observées dans les propriétés de deux concentrés d'amylase obtenus à partir de bactéries de la même espèce mais de provenance différente. Afin de vérifier s'il en était de même sur des produits purs, ces deux enzymes ont été purifiés et cristallisés: nous décrivons et comparons ici les propriétés des  $\alpha$ -amylases de *B. subtilis* de souche «*Takamine*»<sup>5)</sup> et de souche «*Kalle*»<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Communication précédente: *J. Fellig, Eric A. Stein & Ed. H. Fischer*, *Helv.* **40**, 529 (1957).

<sup>2)</sup> Adresse actuelle: *Battelle Memorial Institute*, Genève.

<sup>3)</sup> Boursier de la *Fondation pour Bourses dans le domaine de la Chimie*.

<sup>4)</sup> Department of Biochemistry, University of Washington School of Medicine, Seattle, Wash. (U.S.A.).

<sup>5)</sup> Obtenu à partir de «*Bacterial Amylase Concentrate*», *Takamine Labs., Inc.*, Clifton, N. J., U.S.A.

<sup>6)</sup> Obtenu à partir de «*Biolase*», *Kalle & Co.*, Wiesbaden, Allemagne.