

SUMMARY.

The purification and crystallization of an α -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 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 α -amylases de *B. subtilis*.

Sur les enzymes amylolytiques 24¹⁾

par R. Menzi²⁾, Eric A. Stein³⁾ et Ed. H. Fischer⁴⁾.

(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 α -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 α -amylases de *B. subtilis* de souche «*Takamine*»⁵⁾ et de souche «*Kalle*»⁶⁾.

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

²⁾ Adresse actuelle: *Battelle Memorial Institute*, Genève.

³⁾ Boursier de la *Fondation pour Bourses dans le domaine de la Chimie*.

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

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

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

Purification et cristallisation. De récents travaux dans ce laboratoire ont montré que les préparations d'amylase obtenues par les méthodes habituelles pouvaient subir, dans certaines conditions, une perte d'activité résultant d'une dégradation de la molécule. Ce phénomène put être attribué, en partie tout au moins, à la présence de traces de protéases accompagnant l'enzyme en cours de purification. Pour éviter cette éventualité, les amyloses furent purifiées en présence d'un inhibiteur d'enzymes protéolytiques, le diisopropyle-fluorophosphonate (DFP).

L' α -amylase de *B. subtilis*, souche *Kalle*, a été cristallisée à l'aide d'une méthode très semblable à celle mise au point pour la purification de l'enzyme de souche *Takamine*⁷⁾.

Activité enzymatique. Les deux amyloses de *B. subtilis* se distinguent des α -amyloses animales et de végétaux supérieurs du fait qu'elles ne nécessitent l'addition d'aucun activateur pour manifester leur activité enzymatique. On sait en effet que l'amylase humaine (pancréas et salive) et celle de pancréas de porc, sont inactives en l'absence d'anions monovalents (Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, etc.) alors que l' α -amylase de malt demande la présence d'ions calcium. A ce point de vue, les amyloses bactériennes (*B. subtilis*, *Pseudomonas saccharophila*)⁸⁾ s'apparentent plutôt à l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae*⁹⁾, qui, elle non plus, ne nécessite l'addition d'aucun ion particulier pour manifester toute son activité¹⁰⁾.

De même que dans le cas des autres α -amyloses, les réactions catalysées par les deux enzymes bactériens sont d'ordre zéro pour une dégradation du substrat inférieure à 12%. En effectuant les dosages à des concentrations d'enzyme telles que cette valeur ne soit pas dépassée, on trouve des vitesses de réaction proportionnelles à la quantité d'enzyme en jeu. Après trois cristallisations successives, ces deux enzymes présentent une activité spécifique de l'ordre de 12000 unités par mg d'azote¹¹⁾, considérablement supérieure à celle des autres α -amyloses¹²⁾.

Activité en fonction du pH. Les deux enzymes sont actifs entre les pH 3,0 et 9,5 avec une zone optimum entre 5,2 et 6,4 (fig. 1).

Stabilité en fonction du pH. Les deux enzymes bactériens sont caractérisés par leur remarquable stabilité en milieu alcalin. A pH 12, ils conservent encore 95% de leur activité après 20 heures d'incubation à 20°. Par contre, ils sont relativement instables en milieu acide, mais l'addition d'ions Ca⁺⁺ les protège considérablement (fig. 2).

Coefficients de température et énergie d'activation. L'activité des deux enzymes a été déterminée en fonction de la température, à pH 6,4. Leur optimum d'action se trouve aux environs de 55°, mais cette valeur varie énormément selon le degré de pureté de l'enzyme et surtout selon la nature et la concentration des sels présents, les cations divalents ayant un effet stabilisateur à température élevée. Au delà de la température optimum d'action, l'enzyme est très rapidement désactivé. Des coefficients de température identiques ont été trouvés pour les deux enzymes (tableau I).

Au dessus de 30°, les dosages d'activité sont sujets à certaines variations dues très probablement à une instabilité de l'enzyme purifié.

⁷⁾ Contrairement aux extraits obtenus à partir des produits «*Takamine*», les extraits de «*Biolase*» forment des solutions extrêmement visqueuses. Aussi faut-il extraire l'enzyme dans un volume double (600 cm³) de celui indiqué dans la communication précédente. Par contre, le fractionnement qui suit l'extraction se fait à l'aide de sulfate d'ammonium solide, en présence de 1 g/l d'acétate de calcium.

⁸⁾ A. Markovitz, H. P. Klein & Ed. H. Fischer, *Biochim. et biophys. Acta* **19**, 267 (1956).

⁹⁾ Ed. H. Fischer & R. de Montmollin, *Helv.* **34**, 1987, 1994 (1951).

¹⁰⁾ L. L. Campbell, Jr., *Arch. Biochemistry and Biophys.* **54**, 154 (1955), rapporte que les α -amyloses de deux bactéries thermophiles facultatives (*B. stearothermophilus*, souche 1518, et *B. coagulans*, souche 43 P) seraient partiellement activées par l'ion chlore.

¹¹⁾ Voir ¹⁾, note 15.

¹²⁾ Kurt H. Meyer, *Experientia* **8**, 405 (1952).

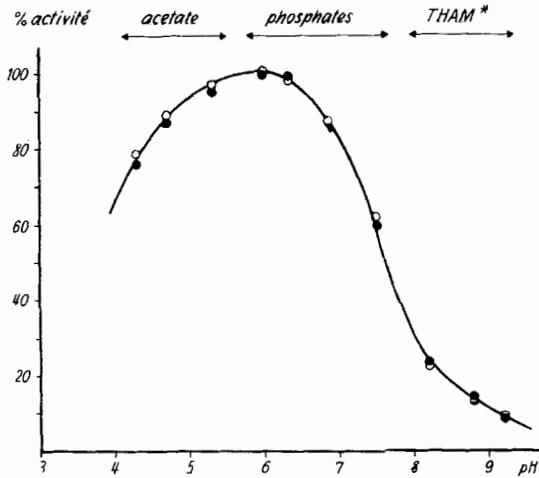


Fig. 1.

Activité en fonction du pH.

Du fait des larges variations d'activité, les dosages sont effectués en incubant l'enzyme pendant 5 min (au lieu de 3) à 25° en présence de 1 volume d'une solution d'amidon «Noredux» à 1%, 0,04-m. en tampon et 0,01-m. en NaCl.

—○— α-amylase, souche *Takamine*. ●—● α-amylase, souche *Kalle*.

*) THAM = tris-hydroxyméthyl-aminométhane.

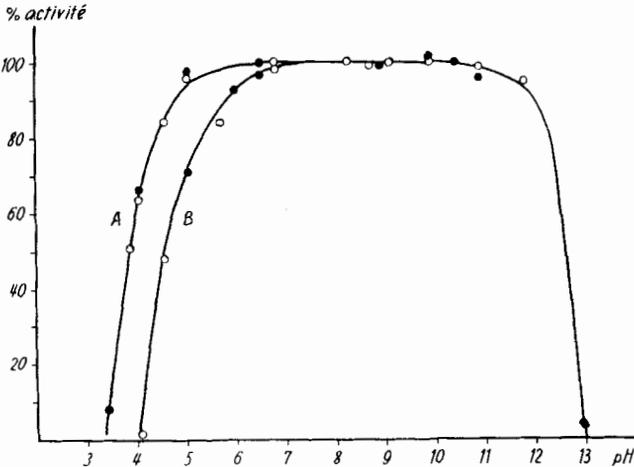


Fig. 2.

Stabilité en fonction du pH.

Les enzymes sont incubés à 20° en présence des tampons suivants: lactate (entre pH 3 et 4), acétate (pH 4 à 6), maléate (pH 6 à 7), véronal (pH 8 à 9,2), glycolle (pH 9,9 à 12). Le pH 13 est obtenu par du NaOH 0,1-m. Courbe A: après 2 h d'incubation; courbe B: après 20 h. Les dosages d'activité sont effectués au pH habituel (6,0), après dilution de l'enzyme dans le tampon glycérophosphate¹¹).

—○— α-amylase, souche *Takamine*. ●—● α-amylase, souche *Kalle*.

Tableau I.

Coefficients de température*) des α -amylases de *B. subtilis*.

Intervalle de température	0—10°	5—15°	10—20°	15—25°	20—30°	25—35°
α -amylase de souche <i>Takamine</i>	2,7	2,1	2,0	2,0	1,6	1,3
α -amylase de souche <i>Kalle</i> . .	2,7	2,0	2,0	2,0	1,6	1,4

*) Rapport des vitesses de réactions à (T^0) et à (T^0-10^0).

Un diagramme selon *Arrhenius* montre que ces deux amylases présentent une double énergie d'activation, le point d'inflexion s'établissant vers 12°. Des valeurs de 15000 ± 200 cal/mole ont été trouvées entre 0 et 12°, et de 11000 ± 300 cal/mole en dessus de 12°¹³⁾.

Spectre d'absorption. Les spectres d'absorption dans l'ultra-violet des deux enzymes sont absolument identiques, présentant un maximum à 280 m μ , et une épaule entre 287 et 291 m μ (fig. 3). Des coefficients d'absorption $E_{280}^{1\text{cm}} = 15,9 \pm 0,1$ par mg d'azote et 2,52 par mg de protéine ont été trouvés pour les deux amylases.

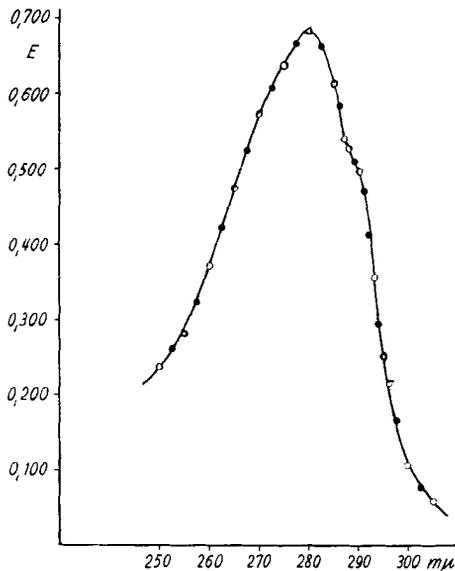


Fig. 3.

Spectre d'absorption.

Concentration en protéine: 0,27 mg/cm³, pH 6,5;
cuves de 1 cm; spectrophotomètre *Hilger* modèle H 700/302.

○—○—○ α -amylase, souche *Takamine*. ●—●—● α -amylase, souche *Kalle*.

¹³⁾ *Markovitz et al.*⁸⁾ rapportent pour l' α -amylase de *P. saccharophila* – un enzyme adaptatif – des énergies d'activation de 14400 et de 8500 cal/mole, avec point d'inflexion à 15°.

Sédimentation. Les ultracentrifugations furent effectuées à plusieurs concentrations d'enzyme, à pH 8,55. Les diagrammes obtenus ne montrent qu'un seul composant, indiquant que sous ces conditions, les deux enzymes sont monodispersés (voir fig. 3 de la communication précédente¹⁾). Une valeur $S_{20,w} = 5,4 \pm 0,1$, identique pour les deux enzymes, a été trouvée après extrapolation pour une concentration zéro en protéine (fig. 4).

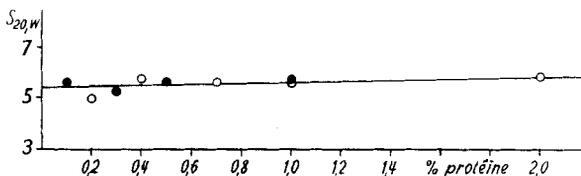


Fig. 4.

Constantes de sédimentation en fonction de la concentration en protéine.

Les ultracentrifugations ont été effectuées à 20° dans un tampon véronal-acétate, pH 8,55, $\mu = 0,1$, à 59780 t/min. Appareil *Spinco* modèle E.

—○— α-amylase, souche *Takamine*. —●— α-amylase, souche *Kalle*.

Electrophorèses. Les électrophorèses des deux enzymes ont été effectuées dans des conditions identiques et à plusieurs pH (tableau II).

Tableau II.

Mobilités électrophorétiques*) de l'α-amylase de *B. subtilis* des souches *Takamine* et *Kalle*.

Tampons	Force ionique	Mobilités*) $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$		
		pH	<i>Takamine</i>	<i>Kalle</i>
véronal-acétate .	0,1	8,55	-3,0	-2,9
phosphate . . .	0,1	6,8	-2,4	-2,3
acétate	0,1	5,52	-0,42	-0,42

*) Calculées sur les diagrammes ascendants et descendants. Les électrophorèses ont été effectuées sur l'appareil *Spinco*, modèle H.

Discussion.

Jusqu'à présent, presque tous les travaux traitant des problèmes de spécificité dans le domaine des enzymes ont été consacrés à la spécificité d'action de ces catalyseurs. On définit ainsi la sélectivité avec laquelle un enzyme attaque un substrat donné ou, lorsque plusieurs substrats plus ou moins étroitement apparentés peuvent réagir, la raison et l'importance de cette réactivité. Il s'agit donc plutôt d'une «spécificité de substrat» qui peut être exprimée, pour un enzyme donné, par sa constante de *Michaelis* (constante apparente de dissociation du complexe enzyme-substrat) et sa vitesse de réaction (décomposition de ce complexe en enzyme plus produits de réaction) pour chaque substrat particulier¹⁴⁾. C'est à l'étude de la spécificité d'action

¹⁴⁾ Cette vitesse de réaction peut être nulle dans le cas d'un inhibiteur compétitif.

qu'ont été consacrés les travaux aujourd'hui classiques de *Helferich*¹⁵⁾ et *Pigman*¹⁶⁾ sur les glucosidases, de *Bergmann*¹⁷⁾ et *Neurath*¹⁸⁾ sur les protéases et peptidases, entre autres.

Beaucoup plus rares sont les travaux consacrés à la spécificité des enzymes eux-mêmes, c'est-à-dire touchant aux problèmes de variation de spécificité ou de structure que l'on observe selon l'origine de la protéine. Alors que les premiers travaux semblaient indiquer que la «spécificité de structure» des enzymes dépend avant tout de l'espèce – et non de l'organe – dont ils proviennent (catalases¹⁹⁾, amylases²⁰⁾, il apparaît aujourd'hui que cette vue ne doit pas être généralisée. Ainsi, on connaît déjà plusieurs exemples d'enzymes provenant d'un même animal, mais qui varient considérablement quant à leurs propriétés ou à leur spécificité de substrat, selon l'organe dont ils sont extraits. En comparant l'affinité des hexokinases de foie, de muscle et de cerveau de Lapin, *Slein, Cori & Cori*²¹⁾ ont montré que ces trois enzymes diffèrent quoiqu'ils exercent la même fonction dans le métabolisme des hydrates de carbone²²⁾. De même, des différences ont été observées entre les phosphorylases de foie et de muscle chez cet animal, et cette situation se retrouve dans le cas des phosphatases et de plusieurs enzymes d'oxydo-réduction. Enfin, on sait aujourd'hui qu'une même cellule peut posséder deux enzymes distincts catalysant exactement la même réaction – sans qu'on sache la raison de cette duplication de moyens. C'est le cas par exemple des deux deshydrogénases isocitriques de levure, dont l'une utilise le TPN²³⁾ comme coenzyme, alors que la seconde est spécifique au DPN²³⁾ et demande l'ac. adénylique comme activateur²⁴⁾.

Plusieurs difficultés expliquent pourquoi les travaux consacrés à la spécificité de structure des enzymes sont relativement peu nombreux. D'abord pour entreprendre une telle étude, il est indispensable de pouvoir disposer de quantités importantes d'un matériel non seulement très pur, mais encore aussi «intact» ou «natif» que possible. Cette dernière condition est la plus difficile à réaliser. En effet, dès que les

¹⁵⁾ *B. Helferich*, *Enzymes (J. B. Sumner & K. Myrbäck)*, Vol. I, 79. Academic Press, 1950.

¹⁶⁾ *W. W. Pigman*, *Advances in Enzymol.* **4**, 41 (1944).

¹⁷⁾ *M. Bergmann & J. S. Fruton*, *Advances in Enzymol.* **1**, 63 (1941); voir aussi **2**, 49 (1942).

¹⁸⁾ *H. Neurath & G. W. Schwert*, *Chem. Rev.* **46**, 69 (1950).

¹⁹⁾ *R. K. Bonnichsen*, *Arch. Biochemistry* **12**, 83 (1947).

²⁰⁾ *P. Bernfeld, F. Duckert & Ed. H. Fischer*, *Helv.* **33**, 1064 (1950).

²¹⁾ *M. W. Slein, G. T. Cori & C. F. Cori*, *J. biol. Chemistry* **186**, 763 (1950).

²²⁾ Ces auteurs montrèrent qu'alors que le muscle et le foie possèdent des hexokinases distinctes pour effectuer la phosphorylation du glucose et du fructose, le cerveau ne possède qu'un seul enzyme phosphorylant le glucose, le fructose et le mannose (s'apparentant, sous ce rapport, à l'hexokinase de levure).

²³⁾ DPN, TPN = di- et triphosphopyridine-nucléotide.

²⁴⁾ *A. Kornberg & W. E. Pricer*, *J. biol. Chemistry* **189**, 123 (1951).

conditions physiologiques sont bouleversées par les procédés d'extraction et de purification, un enzyme peut subir certaines altérations qui modifieront éventuellement ses propriétés physico-chimiques. Comme ces altérations ne se manifesteront pas nécessairement par une variation de l'activité spécifique, elles pourront échapper aux contrôles habituels effectués en cours de purification.

Dans une étude comme celle-ci, dans laquelle on compare les propriétés de deux enzymes provenant de deux matériels de départ différents, le problème se complique encore du fait qu'il est toujours possible que ces produits contiennent, à des degrés variables, des substances étrangères capables de modifier leurs propriétés. *Akabori*²⁵⁾ a mentionné que l'amylase d'*A. oryzae* isolée à partir d'une culture en milieu synthétique contient dix fois moins d'hydrates de carbone qu'un même enzyme isolé à partir d'une culture en milieu naturel; ces sucres ne purent être éliminés même après plusieurs recristallisations successives. Dans certains cas, et en particulier dans celui qui nous occupe, ces impuretés peuvent être des protéases capables de dégrader l'un des matériels plutôt que l'autre. Des différences de propriétés qui pourraient résulter de telles dégradations (celles-ci peuvent se réduire à la scission d'une seule liaison peptidique) pourraient être interprétées à tort comme étant la preuve d'une différence réelle entre les deux enzymes.

Enfin, une dernière difficulté provient de ce qu'aucune technique particulière, par elle même, n'est suffisante pour établir l'identité de deux protéines. Ainsi, la méthode immunologique, considérée à juste titre comme étant l'une des plus sensibles, s'est révélée peu efficace pour la différenciation de certaines molécules étroitement apparentées (prolactines de Bœuf et de Mouton²⁶⁾, hémoglobines A et S²⁷⁾, etc.) alors que l'analyse des acides aminés, la solubilité et certaines autres propriétés physico-chimiques permirent de les distinguer clairement.

Il est bien certain que la simple comparaison des propriétés des deux enzymes qui nous intéressent ne constitue qu'un premier pas dans l'étude de leur spécificité de structure. Néanmoins, la concordance remarquable de leurs propriétés physico-chimiques et enzymatiques nous incite fortement à croire à leur identité.

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

Nous remercions *M. Roger Wade* pour l'aide qu'il nous a apportée au cours de ce travail.

Cette étude a été effectuée avec l'appui du *Fonds pour l'Encouragement des Recherches Scientifiques* (Berne), de l'*Initiative 171* de l'Etat de Washington (U.S.A.) et d'*Eli Lilly & Co.*, Indianapolis (U.S.A.).

²⁵⁾ *H. Hanafusa, T. Ikenaka & S. Akabori*, *J. Biochemistry* (Japon) **42**, 55 (1955).

²⁶⁾ *H. W. Bischoff & W. R. Lyons*, *Endocrinol.* **25**, 17 (1939); cf. *C. H. Li*, *The Proteins*, Vol. II A, 595 (*H. Neurath* et *K. Bailey*, éd.), Academic Press, New York (U.S.A.) 1954.

²⁷⁾ *M. Goodman & D. H. Campbell*, *Blood* **8**, 422 (1953); cf. *A. I. Chernoff*, *New England J. Med.* **253**, 322, 365, 416 (1955).

SUMMARY.

The properties of two crystalline α -amylases obtained from two different strains of *B. subtilis* are described. The pH optima, stabilities, temperature coefficients, absorption spectra, sedimentation and electrophoretic mobilities have been determined for both enzymes and found to be identical.

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

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

68. Zur Kenntnis des Coronens.

I. Mitteilung.

Über Carbonsäuren des Coronens

von H. Hopff und H. R. Schweizer.

(14. II. 57.)

Coronen (I) (Formel s. S. 544), das synthetisch schwer zugänglich ist¹⁻⁴), wurde bisher nur wenig untersucht⁵⁾⁶). Es wurde 1932 erstmals von *Scholl & Meyer* ausgehend vom Anthrachinon-1,5-dicarbonsäurechlorid und m-Xylol über das 2,3,8,9-Dibenzocoronen und die Coronen-2,3,8,9-tetracarbonsäure erhalten, welche letztere nicht näher charakterisiert wurde¹). Über andere Carbonsäuren ist nichts bekannt. Das reine Coronen bildet blassgelbe Nadeln, welche bei 442⁰³) schmelzen und im Hochvakuum bereits ab 250⁰ sublimieren. Das technische Coronen, welches aus den Rückständen der Kohlehydrierung gewonnen wird⁷⁾⁸), ist mit geringen Mengen einer roten

¹) *R. Scholl & K. Meyer*, Ber. deutsch. chem. Ges. **65**, 902 (1932).

²) *M. S. Newman*, J. Amer. chem. Soc. **62**, 1683 (1940).

³) *W. Baker, F. Gockling & J. F. W. McOmie*, J. chem. Soc. **1951**, 1118.

⁴) *W. Baker, J. F. W. McOmie & J. M. Norman*, J. chem. Soc. **1951**, 1114.

⁵) *H. Fromherz, L. Thaler & G. Wolf*, Z. Elektrochem. **49**, 387 (1943).

⁶) *J. M. Robertson & J. G. White*, J. chem. Soc. **1945**, 607. — *W. R. Ruston & W. Rüdorf*, Bull. Soc. chim. belges **56**, 97 (1947). — *A. Zinke, F. Hanus & O. Ferrari*, Mh. Chem. **78**, 343 (1948). — *W. Hagge & K. Hagen*, an *General Aniline & Film Corp.*, AP 2222482 (1939), Chem. Zbl. **1941** I, 3152. — *R. Robl*, an *General Aniline & Film Corp.*, AP 2210041 (1939), Chem. Zbl. **1941** I, 1096. — *A. Zinke & R. Ott*, Mh. Chem. **83**, 546 (1952); **84**, 1132 (1953).

⁷) *IG. Farbenindustrie AG*, EP. 470338 (1936), FP. 816162 (1937), Chem. Zbl. **1937** II, 3846; EP. 510736 (1938), Belg. P. 427268 (1938), FP. 49332 (1938), Chem. Zbl. **1939** I, 3832.

⁸) *L. Boente*, Brennstoff-Chem. **36**, 210 (1955).