

measure the relative intensities of the X-rays in different points of a microradiogram.

The relation between the photographic density and the intensity of the incident X-rays has been investigated by the authors for some fine-grained emulsions (*Agfa Printon* and *Ilford High Resolution*) within the extremely soft X-ray region. Primary X-rays from the X-ray tube earlier described¹ were used and they were filtered through 0,009 mm Al. The voltage, being constant in a single investigation, was varied between 5000 and 500 V, corresponding to a short wavelength limit of the X-rays generated of about 2.5–25 Å. By a small rotating sector with different absorption steps X-rays of different known relative intensities were obtained. The photographic film and the rotating sector were in the high vacuum. The photographic density was measured with a self-registering microphotometer. The photographic films were developed in a normal metol-hydroquinone developer for 3 minutes at 20° C.

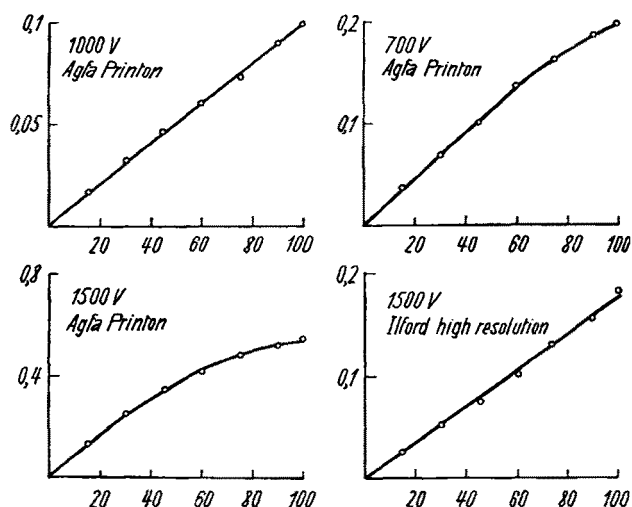


Fig. 1. Photographic density curves for some fine-grained emulsions and very soft X-rays.

Abscissæ: Intensity of X-rays. Ordinates: Photographic density.

Totally about 30 density curves were registered and in Fig. 1 some of them are shown. The density is plotted against the relative intensity of the X-rays and 100 indicates the intensity when no sector was in the beam. The curves show that there is a straight proportionality between the density and the intensity of the X-rays in the first portion of the curve. In all curves, covering the wavelength region 2.5–25 Å, there was a proportionality up to a density value of at least 0.15. Below this value it is thus possible directly to measure the relative intensities of the X-rays from the density measurements without any special calibration of the film.

A. ENGSTRÖM and B. LINDSTRÖM

Department for Cell Research, Karolinska Institutet, Stockholm, August 5, 1947.

Résumé

La courbe d'encre photographique des rayons X de longueurs d'ondes jusqu'à approximativement 25 Å est examinée. La première partie des courbes, jusqu'à un encrage de 0,15 approximativement, est droite.

¹ A. ENGSTRÖM and B. LINDSTRÖM, Exper. 3, 191 (1947).

Purification et cristallisation de l' α -amylase de bactérie

Comme on le sait, il existe deux types d'amylases: les β -amylases qui dégradent les molécules d'amylose et d'amylopectine à partir des extrémités non réductrices, et les α -amylases qui scindent les chaînes de glucose à n'importe quel endroit. On a trouvé des α -amylases notamment dans le malt, le pancréas, la salive, des cultures d'*Aspergillus oryzae* et de quelques bactéries.

L' α -amylase de pancréas de porc a été obtenue récemment en état pur et cristallin¹. Nous rapportons ici l'isolement et la cristallisation de l' α -amylase bactérienne. La cristallisation de l' α -amylase de la salive humaine sera décrite dans la communication suivante.

Produit de départ. Nous nous sommes servis du produit commercial «Biolase». Nous remercions très vivement la maison Kalle & Co. à Wiesbaden d'avoir mis à notre disposition ce produit. L'enzyme est sécrétée par le *Bacillus subtilis* ou *mesentericus*, cultivé dans un milieu azoté, et la «Biolase» est obtenue par précipitation². La «Superclastase» et la «Rapidase» de la Société Rapidase à Seclin sont des produits analogues.

La purification se fait en quatre stades par des précipitations fractionnées au moyen de sels et de solvants organiques à des p_H et températures déterminés.

Cristallisation et recristallisation. Le dernier précipité est dissous dans le minimum d'eau et la solution gardée au froid. Après 24 heures une quantité abondante de cristaux incolores s'est formée. Les cristaux sont lavés plusieurs fois rapidement à l'eau froide et dissous dans un peu d'eau en portant le p_H à 7,8 par NH_4OH 0,1 N. Le p_H est ensuite ramené à 5,6 par CH_3COOH 0,1 N; une quantité abondante de cristaux se forme après 24 heures à froid (voir fig. 1).

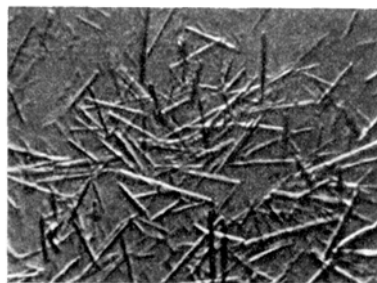


Fig. 1. α -amylase de *Bacillus subtilis* cristallisée. Grossissement 400 fois.

Le produit cristallisé donne les réactions typiques des protéines. Il se comporte comme une substance homogène à l'électrophorèse. Il a une activité de $3,2 \cdot 10^3$ mg de maltose par mg d'azote (méthode voir ³, page 73). Ce quotient n'augmente plus par recristallisation. Les cristaux peuvent donc être considérés comme de l' α -amylase de bactérie pure. Le quotient d'activité par mg d'azote des cristaux est 60 fois plus grand que celui du produit commercial. Le rendement total en activité depuis le

¹ K. H. MEYER, E. H. FISCHER et P. BERNFELD, Helv. chim. Acta 30, 64 (1947); Exper. 3, 106 (1947).

² A. BODIN et J. EFFRONT, Brev. franç. 471546; DRP. 320571/2. – J. EFFRONT, C. R. 164, 415 (1917). – I. A. EFFRONT, Chimie et Industrie 43, 3 (1940). – L. D. BECKORD, G. L. PELTIER et E. KNEEN, Ind. Eng. Chem. 38, 232 (1946).

³ K. H. MEYER, E. H. FISCHER et P. BERNFELD, Helv. chim. Acta 30, 64 (1947).

produit commercial jusqu'à la première cristallisation est de 12%.

La comparaison entre les α -amylases de pancréas et de bactérie montre que ces deux substances ne sont pas identiques, car les p_H optimum de l'activité, l'influence des sels sur l'activité et l'affinité pour le substratum¹ sont différents. L'action sur l'amidon est par contre la même pour les deux amylases.

Ce travail a été encouragé par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

K. H. MEYER, MARIA FULD et P. BERNFELD

Laboratoires de chimie inorganique et organique de l'Université de Genève, le 12 août 1947.

Summary

The purification and crystallization of bacterial α -amylase are described. It is not identical with pancreatic α -amylase, but its action on starch is the same.

¹ P. BERNFELD et H. STUDER, à publier.

Aktivierung einer alkalischen Phosphatase

Die Frage, ob aus einer β -Glycerophosphatase eine prosthetische Gruppe bzw. eine Cophosphatase reversibel abgetrennt werden kann, ist in letzter Zeit wiederholt bearbeitet worden. Daß «alkalische Phosphatase» durch Mg^{++} aktiviert werden, wurde schon 1927 in diesem Institut¹ nachgewiesen. Analoge Wirkungen des Mn^{++} stellten J. ROCHE und Mitarbeiter² fest. Später hat H. ALBERS³ auf Grund von Versuchen, welche von seinen 1935 hier ausgeführten Arbeiten⁴ durchaus unabhängig sind, Cofermentwanderungen angenommen, bei welchen eine Holophosphatase ihr Coenzym an eine zweite Apophosphatase abgibt, so daß also der Aufbau einer neuen Phosphatase postuliert wird⁵. Einige Jahre später schrieb D. ALBERS⁶, daß es ihm gelungen sei, durch Dialyse aus einer alkalischen Phosphatase ein Coenzym abzutrennen, welches wieder ein Apoenzym aktiviert, und ähnliche Angaben machte A. RUFFO⁷. Spezielle Vorstellungen über die Konstitution der alkalischen Phosphatase hat dann R. CLOETENS⁸ entwickelt.

Die Entscheidung, ob solche Cophosphatase, wie die beschriebenen, tatsächlich existieren, erscheint um so wichtiger, als hochgereinigte Präparate von β -Glycerophosphatase auch aus Nukleotiden PO_4 abspalten und das Coenzymproblem auch die Nukleotidasen betrifft. Vermutlich besitzen auch die alkalischen Phosphatase einen hohen Grad von Substratspezifität.

Die Reinigung unserer Darmphosphatase beschreiben wir an anderer Stelle und kommen dann auf die bemerkenswerten Ergebnisse von J. ROCHE und seiner Mitarbeiter⁹ zurück, nach welchen die alkalische Phos-

phatase ein Metallprotein ist und durch Alanin aktiviert wird¹.

Auf eine vorhergehende Untersuchung von EULER, HAHN und SALUSTE² über β -Glycerophosphatase aus Darmschleimhaut von Kalb verweisend, konzentrieren wir uns hier auf die Beschreibung von Dialyse- und Elektrophoreseversuchen, welche sich auf den Nachweis einer Cophosphatase beziehen.

Methodik

Substrate. Reines β -Glycerophosphat verdanken wir Herrn Direktor Dr. O. BAILLY, Montreuil-sur-Bois.

Die PO_4 -Abspaltung wurde bei $p_H = 9,2$ in $NH_3 - NH_4Cl$ -Pufferlösung unter Zugabe von Magnesiumsulfat bei 37° C kolorimetrisch im Stufenphotometer verfolgt. Das früher beschriebene Verfahren wurde insofern modifiziert, als die Menge des zugesetzten Magnesiums auf das Dreifache erhöht wurde (0,5 ml Mg-Azetatlösung enthaltend 3 mg Mg/ml pro Ansatz). Auf diese Weise wird auch bei weitgehender Spaltung und Ausfällen von $MgNH_4PO_4$ ein Überschuß von Mg gesichert. Das Abbrechen der Enzymreaktion erfolgte durch Zusatz von 2 ml 0,5% Ammoniummolybdatlösung in 3% Schwefelsäure + 5% Trichloressigsäure.

Als Maß der Aktivität wurde, wie in der früheren Mitteilung, der reziproke Wert der Zeit (Minuten) gewählt, der zur Abspaltung von 10% Phosphat durch 1 ml Enzymlösung erforderlich ist.

Spezifische Aktivität = Aktivität per mg Trocken-substanz.

Über absolute Aktivitäten von Alkali-Phosphatase-Präparaten ist bisher wenig bekanntgeworden. Die von H. ALBERS³ berechnete Einheit entspricht 0,1 unserer an β -Glycerophosphat gemessenen Einheit (β -glph. Einh.), unter Voraussetzung, daß die PO_4 -Abspaltung zwischen 0 und 10% Substrat linear verläuft. H. ALBERS gab für seine Präparate 40–80, im besten Fall 108 Einheiten an. Diese Zahlen entsprechen also 4–8 bzw. 10,8 unserer β -glph. Einheit, während unser elektrophoretisch gereinigtes Präparat 25 β -glph. Einheiten enthielt.

Dialyse

Diese Versuche wurden bei 10° C ausgeführt, und zwar wurde ein elektrophoretisch gereinigtes Präparat

- A gegen fließendes Wasserleitungswasser ($p_H = 6$),
- B gegen fließenden Azetatpuffer, $p_H = 4,5$, Ionenstärke 0,01, und
- C gegen fließenden Boratpuffer, $p_H = 10,5$, Ionenstärke 0,01, dialysiert.

Dialysendauer im Versuch A 96 Stunden, in den Versuchen B und C 48 Stunden. Nach beendeter Dialyse wurde die Aktivität mit der bei gleicher Temperatur aufbewahrten undialysierten Enzymlösung verglichen. Im Versuch A wurde der Gehalt an Trockensubstanz vor und nach der Dialyse ermittelt.

	Aktivität per ml Lösung	Abnahme der Aktivität in % der Ausgangs-Aktivität	Spezifische Aktivität
Vor Dialyse . .	6,5–7,2	0	8,0
Nach Dialyse A	5,5	19	7,9
B	1,4	79	–
C	5,2	23	–

Elektrophorese

Der hierzu verwendete Apparat ist eine Vergrößerung des von HAHN und TISELIUS⁴ beschriebenen Mehrzellen-

¹ Siehe hierzu: C. A. ELVEHJEM und E. B. HART, J. biol. Chem. 134, 425 (1940).

² H. v. EULER, L. HAHN und E. SALUSTE, Svensk Vet. Akad. Ark. f. Kemi 24 A, Nr. 5 (1946).

³ H. ALBERS, Z. physiol. Chem. 261, 43 (1939).

⁴ L. HAHN und A. TISELIUS, Biochem. Z. 314, 336 (1943).

¹ H. ERDTMAN, Z. physiol. Chem. 172, 182 (1927); 177, 211 (1928).

² J. ROCHE, C. R. Soc. Biol. 139, 807 (1944). – J. ROCHE und Mitarbeiter, C. R. Acad. Sci. 219, 102 (1944).

³ H. ALBERS, Z. Angew. Chem. 49, 448 (1936); Ber. Dtsch. chem. Ges. 71, 1913 (1938).

⁴ H. und E. ALBERS, Z. physiol. Chem. 232, 165 und 189 (1935).

⁵ H. ALBERS, Zbl. inn. Med. 63, 111 (1941).

⁶ H. ALBERS, Z. physiol. Chem. 261, 43 und 269 (1939).

⁷ A. RUFFO, Boll. Soc. Ital. Sper. 19, 9 (1941).

⁸ R. CLOETENS, Naturwiss. 28, 252 (1940). – Siehe auch: ERWIN BAUER, Z. physiol. Chem. 248, 213 (1937). – F. CEDRANGOLO, Arch. Sci. Biol. 23, 504 (1937).

⁹ J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI und M. ROGER, C. R. Acad. Sci. 222, 246 (1946). – Arch. intern. Physiol. 54, 209 (1946).