

Das Tetraacetat gab mit β -Pentaacetyl-glucose in der Mischprobe eine starke Schmelzpunktserniedrigung.

Acetylierung. Das mit Pyridin und Acetanhydrid 5 Minuten bei 60° acetylierte Tetraacetat gab quantitativ die bei 135° schmelzende β -Pentaacetyl-glucose.

$$[\alpha]_D = +3,8^\circ \quad (c = 1 \text{ in Chloroform})$$

Die Mischprobe mit β -Pentaacetyl-glucose anderer Herkunft zeigte keine Schmelzpunkts-erniedrigung.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

48. Sur les enzymes amylolytiques III¹⁾.

La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase

par G. Noelting et P. Bernfeld.

(22 XII 47)

Nous avons mis au point une méthode de dosage de la β -amylase, à la fois simple, rapide et précise, qui était nécessaire pour nos travaux. Elle consiste à déterminer photométriquement le maltose formé par action de l'enzyme.

Comme substratum, nous avons choisi l'amylopectine de pomme de terre, préparée avantageusement selon la méthode de Schoch²⁾. Ce produit est stable en solution aqueuse à froid: sa valeur de réduction à blanc n'augmente pas avec le temps comme c'est le cas pour l'amidon Zulkowski; sa solution ne devient pas trouble comme celle de l'amylopectine de maïs, même en présence de quelques pourcents d'amylose. Le maltose formé est dosé par réduction d'acide dinitro-3,5-salicylique à 100° en milieu alcalin, selon Sumner³⁾. On obtient ainsi une coloration brune dont on détermine l'extinction au photomètre. Pour une dégradation de l'amylopectine jusqu'à 10 %, l'activité de l'amylase est directement proportionnelle à l'extinction obtenue, et, partant, à la quantité de maltose formé. On exprime l'activité de la β -amylase en mgr. de maltose hydraté (C₁₂H₂₂O₁₁, H₂O),

¹⁾ II^{me} communication, Helv. **30**, 1904 (1947).

²⁾ Th. J. Schoch, Advances in Carbohydrate Chemistry **1**, 247 (1945).

³⁾ J. B. Sumner, J. Biol. Chem. **62**, 287 (1925).

formé en 3 minutes à 20° dans une solution d'amylopectine à 0,5 %, au p_H 4,8.

De faibles quantités des alcools méthylique ou éthylique, d'acétone ou de toluène dans la solution d'enzyme n'influencent pas le dosage. La présence de sulfate d'ammonium ou de phosphates ne gêne que si leur concentration est suffisante pour diminuer l'alcalinité du réactif. Le thymol et le chloroforme doivent être absents.

La méthode convient également pour le dosage d'activité de l' α -amylase; cette activité sera exprimée en mgr. de maltose apparent, obtenus dans les conditions décrites¹⁾.

Lorsqu'on veut déterminer une limite de dégradation β -amylatique, il est indispensable de vérifier l'absence d' α -amylase dans la solution d'enzyme. La méthode ancienne de *Wijsman*²⁾ est basée sur la différence de vitesse de diffusion de l' α - et de la β -amylase de malt; mais elle est très peu sensible. Aussi avons-nous perfectionné une méthode décrite auparavant³⁾, qui consiste en la mesure de l'action de l'amylase à contrôler, sur la dextrine résiduelle. En effet, la dextrine résiduelle, obtenue par dégradation β -amylatique de l'amylopectine n'est pas attaquée par la β -amylase pure; elle est cependant rendue accessible à l'action β -amylatique après avoir subi une scission par l' α -amylase. On amplifie ainsi l'action de l' α -amylase dont des traces peuvent être décelées.

La dextrine résiduelle obtenue de l'amylopectine de pomme de terre ne convient pas à ce dosage, car cette amylopectine contient du phosphore lié qui s'oppose à l'action de la β -amylase. Sa dextrine résiduelle possèdera de ce fait des groupes terminaux phosphorylés qu'une phosphatase rendra accessible à l'attaque β -amylatique, en faisant croire ainsi à la présence d' α -amylase. C'est pour cette raison que nous avons utilisé la dextrine de l'amylopectine de maïs.

La dextrine résiduelle doit de plus être exempte d'amylose. En effet, l'amylopectine contient généralement une certaine quantité d'amylose qui, en partie, est soustrait à l'attaque de la β -amylase par suite de formation de particules associées (vieillessement) et qui est ainsi retenu dans la dextrine. En se redissolvant très lentement, cet amylose est peu à peu dégradé par la β -amylase, ce qui fait croire à la présence d' α -amylase. Nous avons donc débarrassé notre dextrine de l'amylose par adsorption de ce dernier sur du coton⁴⁾.

Nous avons déterminé la sensibilité de la méthode en faisant agir sur la dextrine résiduelle des mélanges d'une solution de β -amylase de malt, purifiée et exempte d' α -amylase, et de faibles quantités d'une

¹⁾ K.H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 64 (1947).

²⁾ H. P. Wijsman, thèse, Amsterdam 1889, voir aussi G. A. van Klinkenberg, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. of Sect. Sci. **34**, 893 (1931).

³⁾ K. H. Meyer, P. Bernfeld et J. Press, *Helv.* **23**, 1465 (1940).

⁴⁾ C. Tanret, C. r. **158**, 1353 (1914).

solution d' α -amylase de bactérie cristallisée¹⁾. En exprimant la quantité des deux amylases par leur activité, mesurée comme décrit, nous avons trouvé que 0,01 % d' α -amylase peuvent encore être décelés (voir tableau 1).

Partie expérimentale.

Dosage de la β -amylase.

Solutions:

1. Tampon p_H 4,8: 10,2 cm³ de CH₃COOH glacial et 30,7 gr. de CH₃COONa, 3 H₂O sont dissous dans de l'eau et la solution est portée à 250 cm³.

2. Réactif: On humecte 1 gr. d'acide dinitro-3,5-salicylique par quelques gouttes d'eau, ajoute lentement et en triturant 20 cm³ de NaOH 2 n. et dilue par environ 50 cm³ d'eau. Après dissolution complète à température ordinaire, on ajoute 30 gr. de sel de *Seignette*, complète la solution à 100 cm³ et filtre à travers un filtre en verre d'Iena G2, sans aspiration. L'extinction de cette solution, mesurée au photomètre de *Pulfrich* avec un filtre vert (S 53) et dans une cuve de 20 mm d'épaisseur, est de 0,11 à 0,12. Cette solution est stable; elle doit être conservée à l'abri du CO₂ de l'air, afin d'éviter une diminution de l'alcalinité.

3. Amylopectine de pomme de terre: Une suspension de 100 gr. d'amidon de pomme de terre dans 100 cm³ d'eau froide est versée lentement dans 5 litres d'eau à 90° sous forte agitation. L'empois ainsi obtenu est additionné de 500 cm³ de cyclohexanol et chauffé pendant 2 heures à 109° dans un autoclave. On laisse refroidir la solution obtenue très lentement jusqu'à température ordinaire (au cours de 8 à 10 heures) en agitant continuellement, puis on refroidit à 0°. Après un repos de 7 jours à 0° on centrifuge pendant 1 heure à 3000 tours/min. On décante la solution surnageante contenant l'amylopectine et précipite cette dernière en faisant couler lentement la solution dans 5 litres d'acétone sous forte agitation. Le précipité est lavé à l'acétone et séché dans le vide sur du silicagel. Le rendement est d'environ 40 gr. On dissout 1 gr. de cette amylopectine dans un peu d'eau chaude, refroidit à la température ordinaire, ajoute 1 cm³ du tampon 1 et porte la solution à 100 cm³. Elle constitue la solution 3.

Mode opératoire:

On porte 1 cm³ de la solution de β -amylase à doser dans une éprouvette placée dans un thermostat à 20°. On ajoute 1 cm³ de la solution d'amylopectine 3 préalablement portée à 20°. On laisse agir pendant 180 secondes et interrompt la réaction par adjonction de 2 cm³ de réactif 2. On plonge l'éprouvette pendant 5 min. dans de l'eau bouillante, refroidit dans un courant d'eau froide et dilue par 20 cm³ d'eau. On compare l'absorption de la solution brune obtenue, avec celle d'un essai à blanc sans enzyme, traité dans les mêmes conditions, en utilisant un filtre vert (S 53, *Pulfrich*) et des cuves de 20 mm d'épaisseur. Les valeurs d'extinction sont exprimées en mgr. de maltose d'après une courbe étalon obtenue comme suit: à 2 cm³ de solution contenant des quantités de maltose variant de 0,2 à 2,0 mgr., on ajoute 2 cm³ de réactif 2. On plonge dans de l'eau bouillante pendant 5 min., refroidit, dilue par 20 cm³ d'eau et compare au photomètre dans les conditions décrites avec un essai à blanc sans maltose.

La solution de β -amylase est diluée de façon à obtenir une dégradation de l'amylopectine inférieure à 10%. La précision de la méthode est de $\pm 2\%$. Pour des essais moins précis, on peut aller jusqu'à 25% de dégradation.

La méthode se prête à des déterminations en série.

¹⁾ K. H. Meyer, M. Fuld et P. Bernfeld, Exper. 3, 411 (1947).

*Contrôle de l'absence d' α -amylase.**Solutions:*

4. Tampon p_H 5,3: 4,5 cm³ de CH₃COOH glacial et 43,5 gr. de CH₃COONa, 3 H₂O sont dissous dans de l'eau et la solution est portée à 250 cm³.

5. Dextrine résiduelle: Une suspension de 60 gr. d'amidon de maïs dégraissé dans 60 cm³ d'eau froide est versée dans 3 litres d'eau à 90° sous forte agitation. L'empois ainsi obtenu est additionné de 300 cm³ de n-butanol et chauffé pendant 2 heures à 109° dans un autoclave. On laisse refroidir à 95° et ajoute sous forte agitation un mélange de 120 cm³ de n-butanol et 120 cm³ d'alcool isoamylique, porté préalablement à 95°. On laisse alors refroidir très lentement jusqu'à la température ordinaire (au cours de 8 à 10 heures) en agitant continuellement, puis on refroidit à 0°. Après un repos de 7 jours à 0°, on centrifuge pendant 1 heure à 3000 tours/min. On décante la solution surnageante contenant l'amylopectine et élimine les alcools par concentration à pression réduite à 35° à environ la moitié du volume original (soit à 1800 cm³). On «rajeunit» à 35° par adjonction de 75 cm³ de NaOH 2 n, ramène au p_H 4,8 par 150 cm³ d'acide acétique 2 n et ajoute immédiatement 4 cm³ d'une solution de β -amylase¹⁾ (activité après dilution 1 à 20: 1,1 mgr. de maltose). On laisse la dégradation se poursuivre pendant 24 heures à 35°. Puis, afin d'éliminer ce qui reste de l'amylose, on fait couler la solution à travers une colonne contenant 60 gr. de coton hydrophile que l'on exprime ensuite. On répète l'opération avec du coton frais, et on procède à un second rajeunissement à 35° par adjonction de 150 cm³ de NaOH 2 n. On porte à p_H 4,8 par 300 cm³ d'acide acétique 2 n et ajoute immédiatement 4 cm³ de la solution de β -amylase. Après un repos de 24 heures à 35°, on détruit l'enzyme par une chauffe de 5 min. à ébullition, puis on refroidit rapidement et filtre la solution. 1 cm³ de cette solution donne une coloration pourpre déjà avec la première goutte d'une solution de KI₃ 0,01 n, aussi bien qu'avec des quantités plus fortes d'iode. Elle ne contient donc point d'amylose. On précipite la dextrine résiduelle en faisant couler cette solution dans 5 litres d'acétone. On centrifuge, lave à l'acétone et sèche au vide. Le rendement est de 15 gr. Une prise de 2 gr. de cette dextrine est dissoute dans de l'eau, additionnée de 1 cm³ de tampon p_H 5,3 (4), et diluée à 100 cm³. Ceci constitue la solution 5.

Tableau 1.

Dextrine résiduelle, concentration	β -Amylase ajoutée, exprimée en activité par cm ³	α -Amylase ajoutée, exprimée en activité par cm ³	Rapport des activités α/β -amylase	Extinction après 6 h. à 25°
1%	—	—	—	0,19 \pm 0,01
1%	0,6	—	—	0,20 \pm 0,01
1%	0,6	0,00006	1:10000	0,24 \pm 0,01
1%	0,6	0,0006	1:1000	0,28 \pm 0,01
1%	0,6	0,002	1:300	0,35 \pm 0,01
1%	—	0,00006	—	0,19 \pm 0,01
1%	—	0,0006	—	0,21 \pm 0,01
1%	—	0,002	—	0,25 \pm 0,01

Action de 0,5 cm³ de solution de β -amylase de malt¹⁾ et de 0,5 cm³ de solution d' α -amylase de bactérie²⁾ à différentes concentrations sur 1 cm³ de dextrine résiduelle 5. Volume total toujours 2 cm³.

¹⁾ Helv. 31, 106 (1948).²⁾ Exper. 3, 411 (1947).

Mode opératoire:

A 1 cm³ de la solution de dextrine résiduelle **5**, on ajoute 1 cm³ de la solution de β -amylase à examiner (activité entre 0,5 et 1,0 mgr. de maltose). Simultanément on fait un essai à blanc en mélangeant 1 cm³ de **5** avec 1 cm³ d'eau. Ces deux solutions sont laissées pendant 6 heures à 25°. On ajoute alors à chacune d'elles 2 cm³ de réactif **2** et on détermine la valeur de réduction comme ci-dessus. En absence d' α -amylase, ces deux solutions donnent la même valeur de réduction. Une quantité de 0,01% d' α -amylase donne par contre déjà une différence (voir tableau).

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

49. Le dosage semi-quantitatif de l'ion sulfurique (SO₄'')
dans les eaux naturelles

par **P. E. Wenger, D. Monnier et I. Hoffmann.**

(22 XII 47)

Ce travail fait partie des recherches que nous avons entreprises sur les dosages semi-quantitatifs au moyen de réactifs sensibles et sélectifs et dont nous avons donné le principe dans des publications précédentes¹⁾²⁾³⁾.

Cette méthode se prête particulièrement bien à l'analyse des ions SO₄'' dans les eaux naturelles, étant donné la faible quantité de sulfates qu'elles renferment (1 à 1000 mgr./l). Les dilutions que l'on effectue pour déterminer la limite de perceptibilité sont relativement peu importantes ce qui permet d'obtenir des résultats présentant une précision satisfaisante. Les ions étrangers s'y trouvent le plus souvent en très faibles concentrations, aussi ne produisent-ils, dans la plupart des cas, que des perturbations insignifiantes. Signalons enfin qu'une fois la limite de perceptibilité obtenue, l'emploi de la balance n'est plus nécessaire. Il est même possible d'établir la méthode sans pesée aucune, en partant d'une eau minérale de composition connue.

Cette méthode est très rapide. Dans les conditions les moins bonnes, elle peut s'effectuer en 15 minutes, lorsque la limite a été déterminée et la formule établie.

¹⁾ P. E. Wenger, D. Monnier et A. Piguet, *Helv.* **29**, 1698 (1946).

²⁾ P. E. Wenger, D. Monnier et Y. Rusconi, *Anal. Chim. Acta* **1**, 190 (1947).

³⁾ P. E. Wenger, D. Monnier et Y. Rusconi, *Helv.* **30**, 1636 (1947).