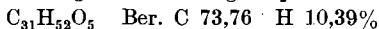


Diacetat (Xb bzw. XIb): 50 mg des Triols (Xa bzw. XIa) wurden in einem Gemisch von 2 cm<sup>3</sup> Pyridin und 2 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid acetyliert und in bekannter Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert und schmolz dann bei 129–130°. Zur Analyse wurde eine Probe 48 Stunden bei 95° im Hochvakuum getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +21,6^\circ \quad (c = 0,625 \text{ in Chloroform})$$

3,583 mg Subst. gaben 9,694 mg CO<sub>2</sub> und 3,389 mg H<sub>2</sub>O



Gef. „ 73,86 „ 10,58%

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

### Zusammenfassung.

Durch katalytische Reduktion des Cholestenon-epoxyds ist es gelungen, auf partialsynthetischem Weg 3α,5-Dioxy-koprostan zu bereiten, das in der räumlichen Anordnung des Asymmetriezentrums 5 der Konfiguration des Strophanthidins und verwandter Aglykone entspricht.

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

### 240. Sur les enzymes amylolytiques VIII<sup>1)</sup>.

#### L'α-amylase de pancréas de porc cristallisée

par Ed. H. Fischer<sup>2)</sup> et P. Bernfeld.

(3 IX 48)

Nous avons décrit l'isolement<sup>3)</sup> puis la cristallisation<sup>4)</sup> de l'α-amylase de pancréas de porc. Nous rapportons ici une méthode simplifiée et améliorée de purification de l'enzyme, sa cristallisation ainsi que ses propriétés.

#### Méthode améliorée de purification.

Nous avons constaté que la stabilité de l'α-amylase de pancréas de porc était considérablement augmentée lors de sa purification, en opérant en milieu alcalin. Ainsi, nous avons pu éviter l'adjonction d'une solution d'amylase bouillie employée naguère pour stabiliser

<sup>1)</sup> VII<sup>me</sup> communication, Helv. **31**, 1735 (1948).

<sup>2)</sup> Boursier de la Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie.

<sup>3)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper. **2**, 362 (1946); Helv. **30**, 64 (1947).

<sup>4)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper. **3**, 106 (1947); Arch. Biochem. **14**, 149 (1947).

l'enzyme. Ceci a non seulement supprimé l'apport d'une quantité considérable d'impuretés à poids moléculaire bas contenues dans ce jus bouilli, mais nous a encore permis d'améliorer les rendements de la purification. En outre, nous avons abandonné la précipitation acétone après le fractionnement salin, dont le but était principalement d'éliminer la majeure partie du sulfate d'ammonium présent. Cette opération, toujours délicate et d'un mauvais rendement, a été remplacée par un échange ionique au moyen de grandes quantités d'Amberlite basique. Ainsi, la substitution de l'ion  $\text{SO}_4^{2-}$  du sulfate d'ammonium par l'ion  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  suit immédiatement la précipitation saline.

Le tableau I rapporte les limites de fractionnement et les rendements de l'ancienne et de la nouvelle méthode.

Tableau I.

Opération	Ancienne méthode			Nouvelle méthode		
	Limites de fractionnement	Rendement par rapport à l'extrait brut %	Degré de pureté *)	Limites de fractionnement	Rendement par rapport à l'extrait brut %	Degré de pureté *)
Extrait brut .			190			190
Acétone I . .	50,5—64%	80	510	48—64%	80	360
Acétone II . .	51—69%	64	1460	46—69%	68	1400
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ I .	0,325 sat.	38	2900	0,360 sat.	58	2700
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ II .	0,225 sat.	30	3300	0,250 sat.	52	3200
Acétone III .	55—65%	18	3350		52	3200
Amberlite . .					47	3500
Sevag . . . .		16,5	3500			
Wofatite . .		16,5	3500			
Acétone IV . .	50—70%	15,0	3500	0—70%	45	3500

\*) Exprimé en mgr. maltose/mgr. azote *Kjeldahl*.

Le rendement total de la purification est donc pratiquement triplé.

*Cristallisation et recristallisation.* La cristallisation de l'enzyme s'effectue à  $\text{p}_\text{H}$  6,5 à partir d'une solution aqueuse concentrée (5 à 8%) du précipité obtenu au dernier stade de la purification. On distingue nettement deux formes cristallines différentes. Celle représentée dans la fig. 4 est métastable et ne s'obtient qu'occasionnellement. En utilisant ces cristaux pour amorcer des solutions d' $\alpha$ -amylase pure, nous n'avons jamais obtenu que la forme cristalline stable (fig. 1 à 3).

On recristallise l' $\alpha$ -amylase en dissolvant les cristaux dans le minimum d'eau portée à  $\text{p}_\text{H}$  8,7, puis en ramenant le  $\text{p}_\text{H}$  de la solution à 6,5. Après deux recristallisations successives, les eaux-mères

présentent le même degré de pureté (exprimé par le quotient mgr. maltose par mgr. N *Kjeldahl*) que les cristaux (tableau II).

Tableau II.

Opération	Pourcentage d'enzyme se trouvant dans la phase solide	Degré de pureté*)	
		cristaux	eaux-mères
Ire cristallisation . . .	80	$3,8 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^3$
Ire recristallisation . . .	75	$4,0 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$
IIIe recristallisation . . .	80	$4,0 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$

\*) Exprimé en mgr. maltose/mgr. azote *Kjeldahl*.

*Pureté de l' $\alpha$ -amylase cristallisée.* La constance du degré de pureté des cristaux et de leurs eaux-mères constitue la preuve que le produit cristallisé est bien l' $\alpha$ -amylase pure. Ceci est confirmé par le fait que l'enzyme cristallisé se comporte comme une substance homogène à l'électrophorèse (fig. 5) — effectuée à différents  $p_H$  — ainsi qu'à l'ultracentrifugation<sup>1)</sup>.

Ainsi, à partir d'un kilo de pancréas frais donnant 200 gr. de poudre sèche, on obtient deux à trois grammes d'enzyme pur. L'amylase forme les 4,5% des protéines contenues dans l'extrait brut de départ.

#### *Propriétés de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc.*

*Nature protéique:* l'enzyme pur contient 15,8% d'azote. Il présente entre autres les réactions du biuret et de la ninhydrine. Il coagule à la chaleur et est dénaturé irréversiblement par l'acide trichloracétique. Comme tous les enzymes connus, l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc est donc une protéine.

*Teneur en phosphore, soufre et sucres:* tandis que l'enzyme cristallisé une seule fois contient encore de 0,3 à 0,6% de phosphore, on peut abaisser cette teneur à moins de 0,05% par plusieurs recristallisations successives. Il en résulte qu'une molécule d' $\alpha$ -amylase (poids moléculaire, voir plus bas) contient moins d'un atome de phosphore. Celui-ci ne peut donc pas faire partie intégrante de la molécule de protéine.

La teneur en soufre de l'amylase recristallisée est également inférieure à 0,05%.

En dosant d'après Bertrand le pouvoir réducteur de la protéine, après hydrolyse acide, nous trouvons moins d'un groupe aldéhydique par molécule.

1) C. E. Danielsson, Nature 160, 899 (1947).

En conséquence, la molécule de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc ne contient ni phosphore, ni soufre, ni sucres réducteurs.

*La solubilité* de l' $\alpha$ -amylase cristallisée est donnée dans le tableau III. Elle a été déterminée à partir de solutions sous-saturées et sursaturées.

La présence des sels suivants, jusqu'à une concentration de 0,03 m., n'a aucune influence sur la solubilité à  $p_H$  6,9: ClNa,  $SO_4Na_2$ ,  $SO_4(NH_4)_2$ ,  $Cl_2Mg$  et glycérophosphate de sodium.

La chaleur moléculaire de dissolution, calculée à partir des valeurs du tableau III, est d'environ 10 000 cal./mol.

Tableau III.

$p_H$	Température	Solubilité exprimée en gr./100 cm <sup>3</sup> *)
6,9	2°	0,22
6,9	25°	1,0
8,0	2°	3 à 4
8,7	2°	6 à 6,5

\*) Dans l'eau pure, ajustée au  $p_H$  par  $NH_4OH$  0,1-n.

*Stabilité de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc.* Les solutions aqueuses de l'enzyme pur sont stables. A  $p_H$  6,9 il n'y a aucune perte d'activité après 1 mois à 2°. L'optimum de stabilité de l'enzyme se place entre les  $p_H$  6,5 et 8,5 (Fig. 6). Par contre, l'enzyme se désactive rapidement en-dessous de  $p_H$  6 et au-dessus de  $p_H$  10. L'enzyme pur ne perd aucune activité par dialyse prolongée à 2° aux  $p_H$  compris entre 7 et 8,5.

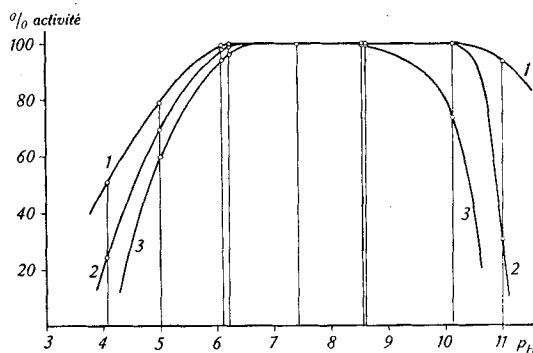


Fig. 6.  
Stabilité de l'enzyme en fonction du  $p_H$ .

Courbe 1: après 30 minutes.

Courbe 2: après 4 heures.

Courbe 3: après 24 heures.

$\alpha$ -amylase de pancréas de porc cristallisée.

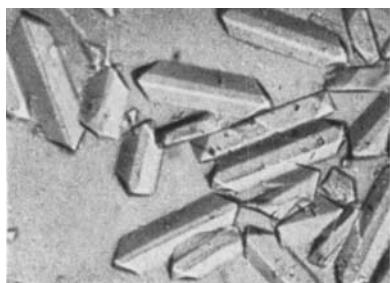


Fig. 1.

220 $\times$

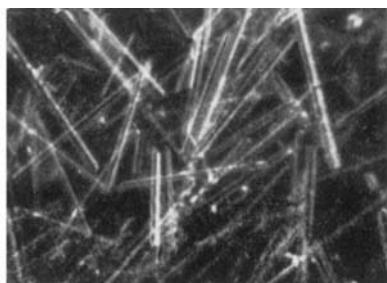


Fig. 2.

220 $\times$

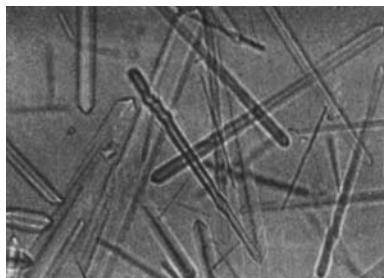


Fig. 3.

220 $\times$

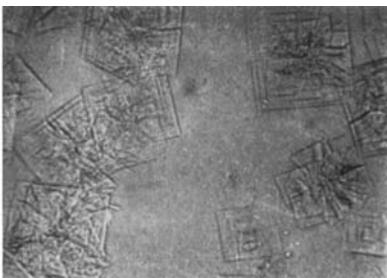


Fig. 4.

150 $\times$

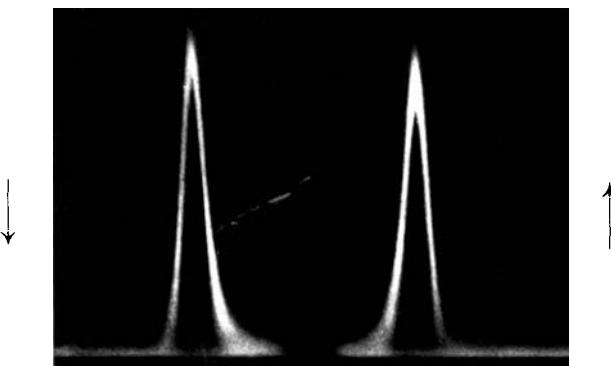


Fig. 5.

Diagramme électrophorétique (*Philpot-Svensson*)

Tampon de *Michaelis*,  $p_H$  6,5  $\mu$  = 0,1

Température 4,0° C. Durée 7320 sec. à 2,74 volts/cm.

Cependant, la présence de faibles quantités d'impuretés, pouvant encore accompagner l'enzyme après une cristallisation, provoque une rapide perte d'activité à la dialyse<sup>1)</sup>.

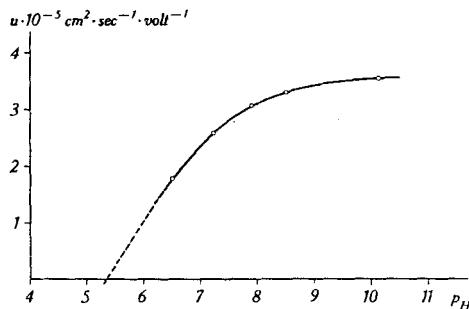
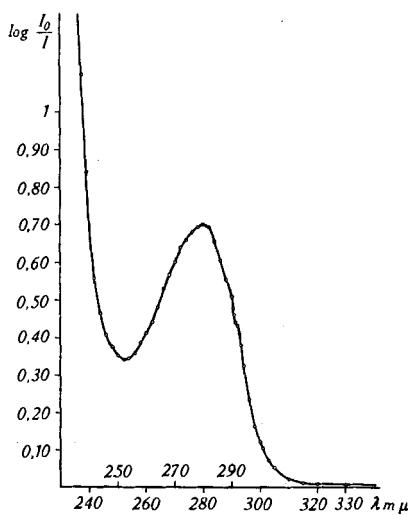


Fig. 7.  
Mobilité électrophorétique de l'enzyme en fonction du  $p_H$ .

La trypsine cristallisée, agissant sur une solution d' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc, à  $20^\circ$  et à  $p_H$  7, ne provoque aucune perte d'activité. Il en est de même pour la lysozyme cristallisée.



Spectre d'absorption de l'enzyme dans l'ultraviolet, déterminé au «Beckman DU photoelectric quartz spectro-photometer».  $c = 0,133$  mgr. substance/cm<sup>3</sup>; cuves: 1 cm. d'épaisseur.

Le «nombre d'action» ou «turnover number» est le nombre d'équivalents de liaisons scindées en 1 minute par un mole d'amylase (voir

<sup>1)</sup> Helv. **30**, 64 (1947).

plus bas le poids moléculaire de l'enzyme). Nous trouvons qu'il est de 25 000 pour l'amylase de pancréas de porc dans les conditions de notre dosage.

*La constante de dissociation de la combinaison d'addition entre l'enzyme et le substratum (constante de Michaelis) a été déterminée<sup>1)</sup>. Elle a pour valeur  $K = 1,8 \cdot 10^{-4}$  gr./cm<sup>3</sup>.*

*Poids moléculaire.* L'ultracentrifugation de l'enzyme cristallisé a été effectuée par Danielsson<sup>2)</sup> à l'Institut de chimie physique de l'Université d'Upsala. A 65 000 t/min. au  $p_H$  8,4, elle donna une valeur moyenne pour la constante de sédimentation de 4,50 S et pour la constante de diffusion — calculée par deux méthodes indépendantes —, la valeur moyenne de  $D = 8,05 \cdot 10^{-7}$ . Un poids moléculaire de 45 000 pour l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc en a été déduit.

*La mobilité électrophorétique u* a été déterminée à cinq  $p_H$  différents. L'enzyme étant désactivé aux  $p_H$  inférieurs à 6, son point isoélectrique ne peut être déterminé que par extrapolation. On peut le situer entre les  $p_H$  5,2 et 5,6 (fig. 7).

Tableau IV.

Activité par mgr. d'azote . . . . .	4000 mgr. de maltose*)
Activité par mgr. d'enzyme pur . . . . .	630 mgr. de maltose*)
Teneur en azote . . . . .	15, 8%
Teneur en phosphore . . . . .	< 0,05 %
Teneur en soufre . . . . .	< 0,05 %
Teneur en sucres réducteurs . . . . .	traces
Optimum d'action . . . . .	$p_H$ 6,9
Optimum de stabilité . . . . .	entre $p_H$ 7 et 8,5
Solubilité dans l'eau à 2°:	
à $p_H$ 6,9 . . . . .	0,22%
à $p_H$ 8,7 . . . . .	6 à 6,5%
Constante de Michaelis**) 1) . . . . .	$1,8 \cdot 10^{-4}$ gr./cm <sup>3</sup>
Nombre d'action (turnover number) . . . . .	25000
Constante de diffusion <sup>2)</sup> . . . . .	$8,05 \cdot 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> ·sec <sup>-1</sup>
Poids moléculaire <sup>2)</sup> . . . . .	45000
Mobilité électrophorétique:	
à $p_H$ 6,5 . . . . .	$1,8 \cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> ·sec <sup>-1</sup> ·volt <sup>-1</sup>
à $p_H$ 7,9 . . . . .	$3,1 \cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> ·sec <sup>-1</sup> ·volt <sup>-1</sup>
à $p_H$ 10,14 . . . . .	$3,55 \cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> ·sec <sup>-1</sup> ·volt <sup>-1</sup>
Point isoélectrique . . . . .	entre $p_H$ 5,2 et 5,6
Spectre d'absorption:	
maximum . . . . .	280 m $\mu$
palier . . . . .	292 m $\mu$

\*) En 3 minutes, à 20°.

\*\*) Pour la combinaison d'addition enzyme-substratum.

<sup>1)</sup> P. Bernfeld et H. Studer-Pécha, Helv. **30**, 1904 (1947).

<sup>2)</sup> C. E. Danielsson, Nature **160**, 899 (1947).

*Le spectre d'absorption* de l'enzyme dans l'ultraviolet montre un maximum à  $280 \text{ m}\mu$  (caractéristique du tryptophane) et un point d'inflexion à  $290 \text{ m}\mu$  (dû à la tyrosine) (fig. 8).

Le tableau IV résume les propriétés de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc.

### Partie expérimentale.

#### Purification.

Le dosage d'activité, la méthode de travail ainsi que les produits utilisés pour la purification ont déjà été décrits<sup>1)</sup>. Toutes les opérations se font entre 0 et  $2^\circ$ . Après chaque adjonction d'acétone, on continue l'agitation pendant 15 min. pour que l'équilibre soit atteint avant les centrifugations. Celles-ci s'opèrent dans une chambre froide à  $4^\circ$  et à 3000 t./min. avec des tubes couverts pour éviter la convection due à l'évaporation du solvant.

La préparation de la poudre sèche de pancréas et celle de l'extrait brut ont été précédemment décrites<sup>1)</sup>.

*Stade I:*  $800 \text{ cm}^3$  d'extrait brut trouble ( $p_{\text{H}} 6,0-6,3$ ; teneur en protéines 4,7%) +  $800 \text{ cm}^3$  d'eau sont additionnés en 45 min. de  $1540 \text{ cm}^3$  d'acétone (48%). On centrifuge 10 min. La liqueur surnageante est additionnée en 30 min. de  $1460 \text{ cm}^3$  d'acétone (64%). On centrifuge 6 min. et dissout le culot dans  $700 \text{ cm}^3$  d'eau.  $p_{\text{H}} 6,6-6,9$ ; teneur en protéines 2,3%.

On refait cette opération sur un deuxième lot d'extrait brut et réunit, pour le reste de la purification, les solutions obtenues.

*Stade II:* On ajoute aux  $1400 \text{ cm}^3$  de la solution du stade I,  $1240 \text{ cm}^3$  d'acétone (46%) en 30 min. et centrifuge 15 min. On ajoute encore à la liqueur surnageante 1 gr. d'acétate de sodium, puis en 30 min.,  $2090 \text{ cm}^3$  d'acétone (69%). On centrifuge 12 min. et dissout le culot dans  $400 \text{ cm}^3$  d'eau.  $p_{\text{H}} 6,6-6,9$ ; teneur en protéines 1,7%.

*Stade III:*  $400 \text{ cm}^3$  de stade II sont portés à  $p_{\text{H}} 8,0$  par  $\text{NH}_4\text{OH}$  n. (environ  $5 \text{ cm}^3$ ) et additionnés d'un coup de  $228 \text{ cm}^3$  d'une solution saturée de sulfate d'ammonium préalablement ajustée à  $p_{\text{H}} 8,0$  par  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0,36 saturation). On attend 45 min., centrifuge 20 min. et porte le culot dissous à  $200 \text{ cm}^3$ .  $p_{\text{H}} 7,8$ ; teneur en protéines 1,8%.

*Stade IV:* On précipite d'un coup les  $200 \text{ cm}^3$  de stade III à 0,250 saturation par la solution de sulfate d'ammonium saturée de  $p_{\text{H}} 8,0$ ; compte tenu du sulfate d'ammonium provenant de l'opération précédente. On attend 45 min., centrifuge 30 min. et dissout le culot dans  $100 \text{ cm}^3$  d'eau.  $p_{\text{H}} 7,8-8,0$ ; teneur en protéines 2,3%.

*Stade V:* On traite pendant 45 min. les  $100 \text{ cm}^3$  de stade IV par 15 gr. d'Amberlite basique IR-4B, saturée à l'acétate de sodium et lavée. On maintient le  $p_{\text{H}}$  au cours de l'échange ionique aux environs de  $7,0-7,5$  en ajoutant peu à peu de l'acide acétique normal. On décante, lave l'Amberlite et répète deux fois encore toute l'opération.

*Stade VI:* On traite la solution précédente neutre pendant 15 min. selon *Sevag*, en la secouant violemment avec 20% vol. de  $\text{CHCl}_3$ , 5% vol. d'alcool iso-amylque et une goutte d'alcool décylique. On centrifuge 30 min., décante la couche aqueuse surnageante et répète l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus, à l'interface eau-chloroforme, qu'une mince couche de protéines coagulées. Trois à six traitements suffisent en général.

<sup>1)</sup> *Helv.* **30**, 64 (1947).

<sup>2)</sup> Les teneurs en protéines indiquées sont les valeurs moyennes obtenues pour un grand nombre de purifications.

<sup>3)</sup> Les chiffres entre parenthèses indiquent la concentration finale en acétone des solutions.

*Stade VII:* On ajoute de l'acétone à la solution précédente de  $p_H$  6,3—6,8, en 30 min., jusqu'à 70%. On centrifuge 15 min., maintient les tubes renversés pendant 2 à 3 min., puis essuie leurs parois afin d'éliminer autant que possible l'acétone. Les culots sont dissous dans le minimum d'eau.

#### *Cristallisation et recristallisation.*

La solution stade VII de  $p_H$  6,5—6,8, contenant 4 à 5% de protéines, est abandonnée à 3° sur une secouuse lente. Après 48 h., 60% de la substance active se trouve sous forme cristallisée, et 70 à 80% après 6 jours. Les cristaux sont rapidement lavés une fois à l'eau froide, puis avec de l'acétone à 30%. On les suspend dans de l'eau et la suspension est ajustée à  $p_H$  8,5—8,7 par  $NH_4OH$  0,1-n. On place le produit sur une secouuse lente à froid et centrifuge la solution après 6 à 12 heures. La liqueur limpide, décantée, contenant 3 à 6% de protéines, est portée à  $p_H$  6,4—6,8 par  $CH_3COOH$  0,1-n. Elle fournit après 48 heures une quantité considérable de cristaux.

#### *Stabilité de l'enzyme en fonction du $p_H$ .*

Solutions-tampons:

$p_H$  4,1; 5,0; 6,22 acétate de sodium-acide acétique, 0,1 mol. en  $ClNa$ ,  $\mu = 0,30$ .

$p_H$  6,12; 7,42; 8,55; véronal-acétate, 0,1 mol. en  $ClNa$ ,  $\mu = 0,224$ .

$p_H$  8,57; 10,14; 11,06; glycocolle- $NaOH$ , 0,1 mol. en  $ClNa$ ,  $\mu = 0,3$ .

On met dans une éprouvette 1  $cm^3$  d'enzyme d'une activité d'environ 150 mgr. maltose/ $cm^3$ , 5  $cm^3$  de tampon, 5 gouttes de toluène et complète par de l'eau à 10  $cm^3$ . Le tube bouché est mis au thermostat à  $20^\circ \pm 0,01^\circ$ . Aux temps voulus, on prélève 1  $cm^3$ , qui est dilué à 10  $cm^3$  par du tampon aux phosphates de  $p_H$  6,9 ( $\mu = 0,02$ ) et l'on dose l'activité sur 1  $cm^3$  de cette nouvelle solution. Pour les  $p_H$  extrêmes, la dilution s'effectue par une solution de phosphate contenant encore des quantités données de  $NaOH$ , respectivement de ClH, pour bien ramener le  $p_H$  à 6,9.

#### *Electrophorèses.*

On dissout l'enzyme cristallisé dans de l'eau à  $p_H$  8,5 ( $NH_4OH$ ), congèle la solution à  $-70^\circ$  et sublime la glace au vide poussé. 220 mgr. de la poudre sèche obtenue sont suspendus dans environ 3  $cm^3$  d'eau. Cette suspension a un  $p_H$  de 6 à 6,5. On la porte au  $p_H$  désiré pour l'électrophorèse en ajoutant du  $NaOHn.$ , puis 0,1-n., en contrôlant le  $p_H$  à l'électrode de verre. On ajoute ensuite 5,0  $cm^3$  d'un tampon de même  $p_H$ ,  $\mu = 0,2$ , puis complète par de l'eau à un volume entre 10,8 et 11,5  $cm^3$ , selon le  $p_H$  employé. Cette solution de protéines est mise en contact, lors de l'électrophorèse, avec le même tampon,  $\mu = 0,1$ . La différence entre la concentration saline de la solution de protéines et celle du tampon diminue considérablement la valeur des gradients extraordinaires  $\delta$  et  $\epsilon$ .

Nous exprimons notre reconnaissance à Monsieur le Professeur *Kurt H. Meyer* pour ses conseils et l'intérêt qu'il a témoigné à nos travaux.

L'un de nous (*E. H. F.*) remercie très vivement le Comité de la *Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie* de l'appui généreux qu'il lui a donné.

Ces recherches ont été encouragées par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

#### RÉSUMÉ.

Une méthode améliorée de purification de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc est décrite. Son rendement total est de 45% à partir de l'extrait brut. L'enzyme a été cristallisé et recristallisé.

Après 3 cristallisations successives, le degré de pureté des eaux-mères atteint celui des cristaux. L'électrophorèse à différents  $p_H$  et l'ultracentrifugation donnent des diagrammes d'une substance homogène. Les cristaux doivent donc être considérés comme de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc pure.

L'enzyme ne contient ni phosphore, ni soufre, ni sucres réducteurs. Sa solubilité a été déterminée à différents  $p_H$ . L'enzyme pur est stable entre les  $p_H$  de 7 et 8,5, même à la dialyse. Son poids moléculaire est de 45 000. Sa mobilité électrophorétique à différents  $p_H$  et son spectre d'absorption dans l'ultra-violet, ont été déterminés.

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

---

#### 241. Sur les enzymes amyloytiques IX<sup>1)</sup>.

**Stabilité et désactivation de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc**

par Ed. H. Fischer<sup>2)</sup> et P. Bernfeld.

(3 IX 48)

La purification de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc par Meyer, Fischer et Bernfeld<sup>3)</sup> a conduit à l'obtention d'un enzyme ne contenant que de très petites quantités d'impuretés, d'après les analyses électrophorétiques. Les solutions de ce produit ainsi que celles des produits moins purifiés perdent assez rapidement leur activité amyloïtique, même à 0°. En dialysant l'enzyme, cette perte d'activité est fortement accélérée. Dans tous les cas, la désactivation est irréversible.

Par contre, ces auteurs ont constaté que l'adjonction d'une solution d'amylase bouillie et filtrée stabilise l'enzyme. En le dialysant contre ce jus bouilli, il ne subit aucune désactivation.

Ces faits ont amené ces auteurs à supposer que l' $\alpha$ -amylase contenait un coenzyme thermostable et dialysable. L'apoenzyme séparé du coenzyme par dissociation subirait une transformation irréversible. La dialyse ne ferait que déplacer l'équilibre de la dissociation.

Nous avons maintenant trouvé que l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc pure obtenue après plusieurs recristallisations est tout à fait stable<sup>4)</sup>. Conservées à 2°, ses solutions neutres ou faiblement alcalines

<sup>1)</sup> VIII<sup>me</sup> communication, Helv. **31**, 1831 (1948).

<sup>2)</sup> Boursier de la «Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie».

<sup>3)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Helv. **30**, 64 (1947).

<sup>4)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Arch. Biochem. **14**, 149 (1947); Helv. **31**, 1831 (1948).