

3. Aux fortes concentrations d'enzyme on obtient d'un seul coup une dégradation correspondant à la scission de 55% des liaisons glucosidiques de l'amyopectine de maïs et de 50% de l'amyopectine de pomme de terre qui contient 0,4% de restes de glucose-6-phosphate.

4. Les produits finals de dégradation d'une amyopectine renfermant environ 4% de groupes terminaux sont formés d'environ 19% de glucose, 73% de maltose et 8% d'isomaltose.

5. Les liaisons 1-6 ne sont pas scindées par les α -amylases.

6. Lors de la dégradation d'une solution d'amidon, les phénomènes observés pour l'amylose et l'amyopectine se superposent. La dégradation de l'empois se complique par la présence de fragments de grains non dissous.

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

34. Purification et cristallisation de la β -amylase de malt. Sur les enzymes amylolytiques XVI¹⁾

par Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer et A. Piguet.

(21 XII 1950).

En 1833, Payen & Persoz²⁾ découvraient dans le malt un ferment amylolytique qu'ils purifiaient par des précipitations alcooliques et qu'ils appelaient «diastase». Schwarzer³⁾ notait en 1870 que la quantité des sucres formés lors d'une dégradation de l'amidon par «l'amylase de malt» est plus faible si l'on opère à une température supérieure à 60°. Il observait en même temps l'apparition d'un trouble dû à une coagulation de protéines.

En 1878, Märcker⁴⁾ émettait l'hypothèse de l'action simultanée de deux enzymes. En reconSIDérant le fait qu'une élévation de la température entraîne une désactivation partielle de l'enzyme, Bourquelot⁵⁾ admettait que «l'amylase de malt» était en réalité composée de deux ou de plusieurs enzymes différents qui seraient successivement détruits. Cette hypothèse fut expérimentalement vérifiée par Wijsman⁶⁾ qui démontra par des essais de diffusion dans des plaques

¹⁾ Précédente communication Helv. **33**, 1064 (1950).

²⁾ J. B. Sumner & G. F. Somer, Chem. and Methods of Enzymes, New York 1943.

³⁾ A. Schwarzer, J. pr. Ch. **1**, 212 (1870).

⁴⁾ M. Märcker, C. **1878**, 559.

⁵⁾ E. Bourquelot, C. r. **104**, 576 (1887).

⁶⁾ M. H. P. Wijsman, R. **9**, 1 (1890).

de gélatine la présence dans la diastase de deux ferment dont la vitesse de diffusion et l'action enzymatique différaient. En 1926, *E. Ohlsson*¹⁾ publiait les premiers travaux fondamentaux sur les enzymes amylolytiques du malt dans lesquels il étudiait l'action propre à chaque enzyme. Il constatait qu'on peut les séparer du fait que le premier résiste à une température de 70° qui détruit le second, alors que celui-ci supporte des pH fortement acides qui désactivent le premier. Il trouva de plus que l'enzyme thermostable produit dès le début de la réaction un fort abaissement de la viscosité d'un en.pois d'amidon, alors que l'enzyme thermolabile produit immédiatement du maltose. C'est pourquoi il appelle ces deux enzymes: amylase dextrinogène et amylase saccharogène. *Kuhn*²⁾ appelait α - et β - ces deux amylases selon la forme isomérique du maltose libéré et c'est actuellement la nomenclature la plus utilisée.

Depuis, *Blom* et coll.³⁾, *Hanes*⁴⁾, *Samec*⁵⁾, *van Klinkenberg*⁶⁾, *Meyer*⁷⁾, *Hassid*⁸⁾, *Myrbäck*⁹⁾, *Hopkins*¹⁰⁾ ont étudié en détail le comportement des deux amylases vis-à-vis de l'amidon, ou de l'amylose et de l'amylopectine séparément. La β -amylase scinde exclusivement les liaisons α -1,4 glucosidiques à partir des extrémités non réductrices des chaînes, pour donner du β -maltose et des dextrines résiduelles. L' α -amylase scinde les mêmes liaisons en un point quelconque de la molécule d'amidon et forme des dextrines et de l' α -maltose. Le malt, produit de la germination de l'orge, contient les deux enzymes, alors que l'orge non germée est presque exempte d' α -amylase. Celle-ci apparaît au cours de la germination¹¹⁾.

Malgré ces faits, un grand nombre d'auteurs continuent de parler des propriétés de «l'amylase de malt» sans se soucier du fait qu'il s'agit de deux enzymes parfaitement distincts. *C. Oppenheimer*¹²⁾ et *Waldschmidt-Leitz*¹³⁾ avaient même nié la présence de deux amylases dans le malt, mais avaient supposé un changement d'activateurs accompagnant l'enzyme.

1) *E. Ohlsson*, Z. physiol. Ch. **189**, 17 (1930).

2) *R. Kuhn*, A. **443**, 1 (1925).

3) *J. Blom*, *A. Bak & B. Braae*, Z. physiol. Ch. **241**, 273 (1936); **250**, 104 (1937).

4) *C. S. Hanes*, Canad. J. Research **B13**, 185 (1939).

5) *M. Samec & M. Blinc*, Koll. Beiheteft **49**, 75 (1939).

6) *G. A. van Klinkenberg*, Z. physiol. Ch. **209**, 253 (1932); **212**, 173 (1932).

7) *Kurt H. Meyer*, *P. Bernfeld & J. Press*, Helv. **23**, 1465 (1940).

8) *W. Z. Hassid & R. M. MacCready*, Am. Soc. **65**, 1157 (1943).

9) *K. Myrbäck & O. Johansson*, Arkiv for Kemi **20 A**, Nr. 6, 1 (1945).

10) *R. H. Hopkins*, *B. Jelinek & L. E. Harrison*, Biochem. J. **43**, 32 (1948); *R. H. Hopkins*, *R. H. Murray & A. R. Lockwood*, Biochem. J. **40**, 507 (1940).

11) *E. Kneen & R. M. Sandstedt*, Cereal Chem. **18**, 237 (1941); *E. Kneen*, Cereal Chem. **21**, 304 (1944); *H. Lüers & W. Rümmler*, Wochenschr. für Brauerei **50**, 297 (1933); **52**, 9 (1935); *G. Nordh & E. Ohlsson*, Z. physiol. Ch. **204**, 89 (1932); *G. L. Teller*, J. Biol. Chem. **114**, 425 (1936).

12) *C. Oppenheimer*, Lehrbuch der Enzyme, Leipzig 1927.

13) *E. Waldschmidt-Leitz*, Die Enzyme, Braunschweig 1926.

De nombreuses tentatives de purification des amylases de malt ont été entreprises: précipitations fractionnées à l'alcool¹⁾, au sulfate d'ammonium²⁾, adsorptions sélectives sur l'hydroxyde d'aluminium³⁾, sur l'amidon de riz⁴⁾ et sur le tanin⁵⁾. Par ces méthodes, les auteurs se sont généralement contentés d'éliminer plus ou moins complètement un des enzymes par rapport à l'autre, sans pousser plus avant la purification proprement dite.

Afin de comparer les propriétés respectives des deux enzymes, nous avons entrepris leur purification. Nous décrivons ici la purification et la cristallisation de la β -amylase de malt⁶⁾. Signalons qu'en 1946, *Balls* et coll.⁷⁾ ont rapporté la cristallisation d'une autre β -amylase, la β -amylase de patate douce (*Ipomoea batatas*).

Dosage de la β -amylase. L'activité de la β -amylase est dosée d'après la méthode colorimétrique à l'acide dinitro-3,5-salicylique⁸⁾.

L'unité de β -amylase (activité) est la quantité d'enzyme qui libère 1 mg de maltose en 3 min. à 20° à partir d'une solution à 1% d'amidon *Zulkowski* à pH 4,8. Lors des dosages, la quantité d'enzyme doit être telle que la dégradation du substrat ne dépasse pas 15%.

Le degré de pureté est le rapport activité par mg d'azote (Kjeldahl).

Contrôle de l'absence de l' α -amylase. Nous disposons de deux méthodes: la mesure du rapport pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène (PS/PD), rapide et pratique, mais qui devra être complétée par une attaque sur une β -dextrine résiduelle, qui seule pourra indiquer l'élimination des dernières traces d' α -amylase.

Rapport PS/PD. Le pouvoir réducteur mesuré colorimétriquement à l'acide dinitro-3,5-salicylique rend compte de l'action saccharogène des amylases. L'action dextrinogène propre aux α -amylases peut être facilement mesurée par le changement de la coloration à l'iode d'une amylopectine. Le rapport de ces deux activités peut être ensuite calculé selon *Bernfeld & Fuld*⁹⁾. Pour la β -amylase de patate cristallisée¹⁰⁾, exempté d' α -amylase, il est de 61 environ alors qu'il est

¹⁾ G. A. van Klinkenberg, Proc. Acad. Sci. Amsterdam **34**, 893 (1931); Z. physiol. Ch. **209**, 253 (1932); K. Venhata Giri, Current Sci. **2**, 128 (1933); C. S. Hanes, Canad. J. Research **13 B**, 188 (1935).

²⁾ H. C. Sherman & M. Caldwell, J. Biol. Chem. **104**, 501 (1934).

³⁾ E. Waldschmidt-Leitz & M. Samec, Z. physiol. Ch. **203**, 21 (1931).

⁴⁾ O. Holmberg, Ark. Kem. Mineral. Geol. **11 B**, 4 (1934); **11 A**, 20 (1935); Bioch. Z. **258**, 134 (1933); **266**, 203 (1933); J. Blom, A. Bak & B. Braae, Z. physiol. Ch. **250**, 110 (1937).

⁵⁾ R. Weidenhagen, Z. V. D. Zuck. **83**, 505 (1933).

⁶⁾ Communication préliminaire: Ed. H. Fischer, K. H. Meyer, G. Noelting & A. Piguet, Arch. of Biochem. **27**, 235 (1950).

⁷⁾ A. K. Balls, R. R. Thomson & M. K. Walden, J. Biol. Chem. **163**, 571 (1946); **173**, 9 (1948).

⁸⁾ G. Noelting & P. Bernfeld, Helv. **31**, 286 (1948).

⁹⁾ P. Bernfeld & M. Fuld, Helv. **31**, 1420 (1948).

¹⁰⁾ A. K. Balls, R. R. Thomson & M. K. Walden, J. Biol. Chem. **163**, 571 (1946); **173**, 9 (1948).

de $9,7 \pm 0,2$ pour toutes les α -amylases obtenues à l'état cristallisé¹⁾. On trouve évidemment des valeurs intermédiaires pour un mélange d' α et de β -amylase.

*Dégénération d'une dextrine résiduelle*²⁾. Une solution de β -amylase rigoureusement exempte d' α -amylase n'attaque pas une β -dextrine résiduelle. En laissant l'enzyme et ce substrat en contact pendant plusieurs jours à 20° et en observant l'augmentation du pouvoir réducteur et la persistance de la coloration à l'iode de la dextrine, on peut vérifier si l'élimination de l' α -amylase est réellement totale.

Produit de départ.

On peut partir soit directement de l'orge, soit de malt ou d'extrait de malt. L'orge a l'avantage de contenir très peu d' α -amylase, mais sa concentration totale en amylases est beaucoup plus faible que celle d'un extrait de malt. Nous avons donc choisi un extrait de malt commercial, le «Diastafor», fourni par la maison *Wander* à Berne. La qualité du produit n'est pas constante et des variations assez fortes ont été observées suivant les livraisons. Par contre, il est stable et se conserve parfaitement à froid pendant des mois.

Elimination de l' α -amylase.

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature. La plupart des auteurs³⁻⁶⁾ éliminent l' α -amylase par abaissement du pH, d'autres^{7) 8)} par adsorption sur des grains d'amidon, d'autres encore^{4) 9) 10) 11)} obtiennent une séparation plus ou moins complète par des fractionnements à l'alcool.

Au cours d'essais préliminaires, nous avons utilisé une méthode comprenant deux fractionnements au méthanol suivis d'une précipitation acétonique, comme le décrit *G. Noëltling*¹²⁾. Mais le produit obtenu avec un rendement relativement faible contenait encore une quantité appréciable d' α -amylase. Nous avons alors essayé d'éliminer l' α -amylase par un traitement acide. Dans un premier essai, selon *Blom* et coll.⁷⁾, nous avons travaillé à pH 4,2 et à une température

¹⁾ K. H. Meyer, P. Bernfeld & Ed. H. Fischer, *Helv.* **30**, 64 (1947); K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, A. Staub & P. Bernfeld, *Helv.* **31**, 2158 (1948); Ed. H. Fischer, F. Duckert & P. Bernfeld, *Helv.* **33**, 1060 (1950); K. H. Meyer, P. Bernfeld & M. Fuld, *Exp.* **3**, 411 (1947); S. Schwimmer & A. K. Balls, *J. Biol. Chem.* **176**, 465 (1948); **179**, 1063 (1949).

²⁾ G. Noëltling & P. Bernfeld, *Helv.* **31**, 286 (1948).

³⁾ J. Blom, A. Bak & B. Braae, *Z. physiol. Chem.* **241**, 273 (1936).

⁴⁾ R. H. Hopkins, R. H. Murray & A. R. Lockwood, *Biochem. J.* **40**, 507 (1940).

⁵⁾ E. Ohlsson, *Z. physiol. Chem.* **189**, 17 (1930).

⁶⁾ W. J. Olson, B. A. Burkhardt & A. D. Dickson, *Cereal Chem.* **20**, 126 (1943).

⁷⁾ J. Blom, A. Bak & B. Braae, *Z. physiol. Chem.* **250**, 104 (1937).

⁸⁾ S. Schwimmer & A. K. Balls, *J. Biol. Chem.* **176**, 465 (1948); **179**, 1063 (1949).

⁹⁾ K. Venhata Giri, *Current Sci.* **2**, 128 (1933).

¹⁰⁾ G. A. van Klinkenberg, *Z. physiol. Chem.* **209**, 253 (1932).

¹¹⁾ M. H. P. Wijsman, *R.* **9**, 1 (1890).

¹²⁾ G. Noëltling, Thèse Université Genève N° 1104 (1950).

de 20°. Après 5 h., l'activité enzymatique totale avait baissé de 20%, mais le rapport PS/PD était toujours le même. Nous nous trouvions donc en présence d'une désactivation partielle des deux enzymes. Dans un autre travail, *Blom et coll.*¹⁾ opèrent à pH 3,6 et à une température de 0°. Nous avons expérimenté cette méthode avec succès. Le pH d'une solution aqueuse de Diastafor a été abaissé à 3,6 par l'acide acétique et la totalité de l' α -amylase est pratiquement détruite en moins de 10 min. déjà, à la température indiquée de 0°. Le rapport PS/PD passe de 23 pour le diastafor de départ à 62 pour la solution acide. Les fig. 1 et 2 montrent les variations en fonction du temps de l'activité amylatique totale et du rapport PS/PD pendant le traitement acide.

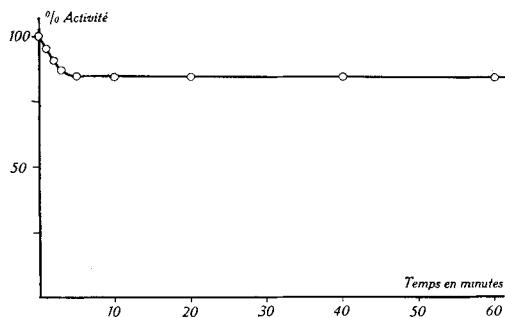


Fig. 1.

Inactivation de l' α -amylase à pH 3,6.
Diminution du pouvoir amyloytique en fonction du temps.

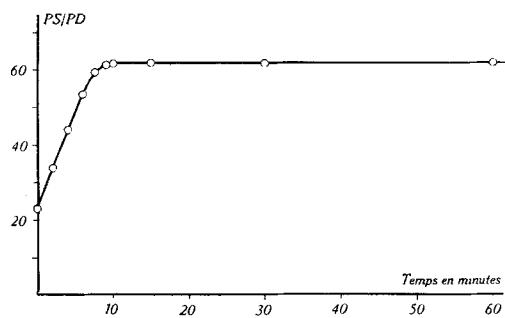


Fig. 2.

Inactivation de l' α -amylase à pH 3,6.
Augmentation du rapport PS/PD en fonction du temps.

Cependant, des essais de dégradation sur une dextrine résiduelle ont montré qu'il peut subsister encore des traces d' α -amylase. Nous avons essayé de prolonger la durée du traitement acide, d'abaisser le pH jusqu'à 3,0, de remplacer l'acide acétique par un acide plus fort

¹⁾ *J. Blom, A. Bak & B. Braae, Z. physiol. Chem. 241, 273 (1936).*

(HCl ou H₂SO₄). Dans tous ces essais, nous n'avons observé que des pertes d'activité sans toujours parvenir à éliminer les dernières traces d' α -amylase.

L'élimination de l' α -amylase doit de plus s'effectuer avant toute autre élimination. En effet, le traitement par l'acide d'un produit déjà fractionné entraîne une très forte désactivation de la β -amylase. Cette différence est probablement due à la présence dans le produit brut de colloïdes protecteurs que l'on élimine dès le début de la purification. Des observations analogues ont d'ailleurs été faites avec la β -amylase de blé.

Elimination des sucres et polysaccharides.

Comme l'ont fait remarquer certains auteurs¹⁾, un polysaccharide semble accompagner la β -amylase lorsque on la purifie par des précipitations au moyen de solvants organiques (méthanol, acétone). Ce polysaccharide ne peut être ensuite que difficilement éliminé par les méthodes habituelles. *Noelting*²⁾ y était parvenu par une précipitation à l'acide picrique, mais qui n'allait pas sans une forte perte de l'activité amylatique. Par contre, nous avons trouvé que par une précipitation unique au sulfate d'ammonium, mais sur le produit brut seulement, on élimine d'un seul coup la quasi totalité des sucres et polysaccharides contenus dans le Diastafor.

Purification de l'enzyme.

Nous avons tout d'abord essayé des fractionnements au sulfate d'ammonium à pH 4,8, puis à pH 7,5 sans obtenir des enrichissements intéressants. Il y a toujours parallélisme entre la répartition de l'activité et celle de l'azote. Nous avons ensuite pensé à adsorber sélectivement l'enzyme, méthode employée avec succès par *Schwimmer & Balls*³⁾ pour la purification de l' α -amylase de malt. Nous avons essayé divers adsorbants: amidons de maïs et pomme de terre, viscose, acide palmitique, amides de l'acide oxalyl-biurétique. Nous avons diminué la solubilité de l'amylase par addition d'alcool, d'acétone, ou de sel (sulfate d'ammonium). Dans aucun cas, nous n'avons réussi à adsorber l'enzyme. Nous avons même observé des désactivations considérables. L'enzyme semble par contre s'adsorber sur l'hydroxyde d'aluminium, mais il nous a été pratiquement impossible d'éluer un produit actif. Nous avons alors essayé des précipitations à l'acétone qui ont donné de bons résultats. Par un premier fractionnement, dans de larges limites (37 à 60%), nous avons éliminé la plus grande partie du sulfate d'ammonium provenant du stade précédent. Puis, par deux nou-

¹⁾ *L. H. Ford & S. Peat, Soc.* **1941**, 856.

²⁾ *G. Noelting, Thèse Université Genève N° 1104 (1950).*

³⁾ *S. Schwimmer & A. K. Balls, J. Biol. Chem.* **176**, 465 (1948); **179**, 1063 (1949).

velles précipitations, à pH 5, puis à pH 7,8 en présence d'acétate d'ammonium, nous avons finalement obtenu un produit qui n'a montré qu'une seule composante à l'électrophorèse à différents pH (pH 3,5; 8,0). Le degré de pureté à ce stade est de 1500 mg maltose/mg d'azote. Le produit ne contient ni sucres ni polysaccharides. Le tableau I rapporte les rendements et enrichissements obtenus à chaque stade de la purification.

Tableau I.

Stade	Opération	Rendement par rapport au produit de départ	Degré de pureté	Enrichissement
—	Diastafor	—	100	—
I	Traitements acide	70%	130	1,3
II	Sulfate d'ammonium . . .	53%	170	1,7
III	Acétone I	45%	280	2,8
IV	Acétone II	32%	650	6,5
V	Acétone III	10%	1500	15,0

Cristallisation et recristallisation.

Le produit obtenu à la dernière précipitation est dissous dans l'eau et porté à 0,24 de saturation par addition de sulfate d'ammonium solide. Le pH se trouve abaissé du même coup à 6,3. Cette solution est concentrée au vide sur du silicagel avec agitation, à une température inférieure à 5°. Après quelques heures, la solution se trouble, et après une quinzaine d'heures, on observe la présence de cristaux quadrangulaires encore accompagnés de matériel amorphe. On continue l'agitation pendant une semaine, sans concentration, puis on centrifuge. Le culot redissous dans l'eau est recristallisé de la même manière. On obtient alors des cristaux carrés ou rectangulaires de β -amylase de malt (fig. 3).

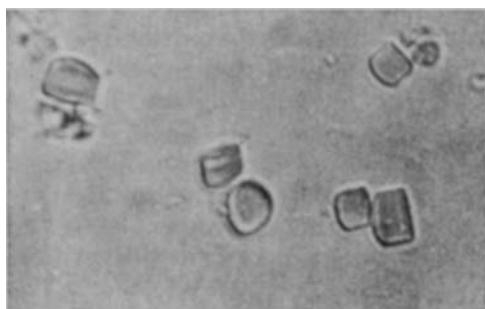


Fig. 3.
 β -amylase de malt cristallisé. (850 \times)

Nous avons mesuré l'activité par mg d'azote protéique des cristaux et des eaux mères de plusieurs recristallisations successives. Comme l'indique le tableau II, le produit trois fois cristallisé a une activité de 1650 mg maltose/mg d'azote sensiblement égale dans les cristaux et dans les eaux-mères et on peut donc admettre que c'est bien la β -amylase qui se trouve à l'état cristallisé.

Tableau II.

Opération	% d'enzyme cristallisé	Degré de pureté	
		cristaux	eaux-mères
1ère cristallisation . . .	69	1600	1360
2ème cristallisation . . .	78	1640	1460
3ème cristallisation . . .	61	1650	1640

Partie expérimentale.

Purification de la β -amylase.

Eau: Distillée sur BaO avec réfrigérant en étain.

Acétone: Redistillée sur permanganate et carbonate de sodium; pureté 98%.

Centrifugations: à 3000 t/min. sauf indication spéciale.

Température: Toutes les opérations ont lieu à une température comprise entre 0 et 5°; les fractionnements se font dans un bain de glace fondante.

Produit de départ: «Diastafor», extrait de malt de la maison *Wander* à Berne. C'est un produit brun, visqueux et collant, riche en sucres réducteurs, en α et β -amylase, et qui contient encore des protéines et des polysaccharides constituant le grain d'orge. Densité moyenne: 1,7 environ; activité¹⁾ α + β -amylases: 1500 à 2500 mg maltose/g diastafor; sucres réducteurs: 400 à 700 mg maltose/g diastafor; azote (*Kjeldahl*): 15 à 25 mg par g de diastafor; degré de pureté: 100 à 125; rapport²⁾ PS/PD = 23 à 25.

1 kg de diastafor est suspendu dans 2 l d'eau distillée. On obtient ainsi 2700 cm³ d'un extrait. Activité (α + β -amylases): 560 mg maltose/cm³; azote: 5,6 mg/cm³.

Stade I: Le pH de l'extrait est amené à 3,6 par 250 cm³ d'acide acétique 8-n. sous agitation modérée. On laisse agir pendant 30 min., puis centrifuge 15 min. Le précipité contient de l' α -amylase dénaturée. La solution surnageante a un volume de 2400 cm³. Activité (β -amylase): 470 mg maltose/cm³; azote: 3,6 mg/cm³; rapport PS/PD = 62.

Stade II: On amène le pH de la solution précédente à 4,5 par addition de 300 cm³ d'ammoniaque 4-n. On ajoute alors d'un seul coup, sous agitation, du sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration de 0,6 sat. On agite encore pendant 20 min., puis centrifuge à la supercentrifugeuse Sharples (50000 t/min.). Le culot est repris par l'eau distillée. On élimine par filtration sur Filter-Cel une importante fraction insoluble et porte le filtrat, qui contient la β -amylase, à 600 cm³ (pH ajusté à 5,0 par quelques gouttes d'ammoniaque 0,1-n.). Activité: 1330 mg maltose/cm³; azote: 7,8 mg/cm³; teneur en sucres réducteurs 0,1-n.). Activité: 1330 mg maltose/cm³; azote: 7,8 mg/cm³; teneur en sucres réducteurs après hydrolyse: moins de 1%.

Stade III: La solution du culot du stade II (600 cm³) est additionnée de 360 cm³ d'acétone jusqu'à 37%³⁾. On agite encore 10 min. et centrifuge 10 min. Le culot est rejeté et la solution amenée à 60% par 590 cm³ d'acétone. On attend 10 min. et centrifuge 10 min. La solution surnageante est rejetée et le culot dissous dans 400 cm³ d'eau. Le pH de la solution est de 5,0. Activité: 1700 mg maltose/cm³; azote: 6,1 mg/cm³.

¹⁾ G. Noelting & P. Bernfeld, Helv. 31, 286 (1948).

²⁾ P. Bernfeld & M. Fuld, Helv. 31, 1420 (1948).

³⁾ Le pourcentage indique la teneur finale en acétone.

Stade IV: La solution du stade III est additionnée de 275 cm³ d'acétone jusqu'à 40%. On laisse agiter 10 min. et centrifuge 10 min. Le culot est rejeté. La solution est portée à 50% par 145 cm³ d'acétone, laissée 5 min., puis centrifugée 10 min. Le culot est repris par 150 cm³ d'eau. Activité: 3000 mg maltose/cm³; azote: 4,6 mg/cm³.

Stade V: On ajoute à la solution du culot stade IV 4 cm³ d'une solution 5-n. d'acétate d'ammonium à pH 7,8. Puis le volume est porté à 200 cm³ et le pH établi à 7,8 par quelques gouttes d'ammoniaque 0,1-n. On précipite alors par 217 cm³ d'acétone jusqu'à 51%, agite 5 min. et centrifuge 10 min. Le culot est rejeté et la solution portée à 56% par 50 cm³ d'acétone. On agite et centrifuge comme précédemment. Le culot est dissous dans 15 cm³ d'eau. Activité: 9350 mg maltose/cm³; azote: 6,2 mg/cm³; teneur en protéines: 4,5% environ.

Cristallisation et recristallisation.

La solution du culot du stade V est amenée à 0,24 sat. par du sulfate d'ammonium solide, puis concentrée au vide sur silicagel avec agitation modérée pendant 24 h. à 3°. On interrompt le vide et agite encore pendant une semaine, puis centrifuge le matériel plus ou moins parfaitement cristallisé. Le culot se redissout complètement dans un peu d'eau. On ajoute quelques cristaux de sulfate d'ammonium jusqu'au premier trouble que l'on dissipe par une goutte d'eau. On concentre comme précédemment et obtient des cristaux quadrangulaires de β -amylase de malt.

Contrôle de l'absence des sucres et polysaccharides.

1 cm³ d'une solution contenant 45 mg de β -amylase cristallisée additionné de 1 cm³ d'acide chlorhydrique n. est chauffé à reflux à 100° pendant 3 h. dans un courant d'azote. Après hydrolyse, on neutralise par environ 1 cm³ de NaOH n. et complète le volume à 4 cm³ par de l'eau distillée. On mesure colorimétriquement le pouvoir réducteur sur une prise de 2 cm³ au moyen de l'acide dinitro-3,5-salicylique. L'extinction étant nulle, aucun sucre n'a pu être décelé. En tenant compte de la sensibilité de la méthode, la teneur en sucres est en tous cas inférieure à 0,1 mg de glucose pour 45 mg d'enzyme.

Ces recherches ont été effectuées avec l'aide des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

RÉSUMÉ.

La purification et la cristallisation de la β -amylase de malt à partir d'un extrait de malt commercial sont décrites.

Après destruction de l' α -amylase en milieu acide et élimination des sucres et polysaccharides par précipitation au sulfate d'ammonium, la β -amylase a été purifiée par différents fractionnements à l'acétone.

L'enzyme a été cristallisé après un enrichissement d'environ 15 fois. On en obtient 450 mg à partir d'un kg d'extrait, avec un rendement total de 10%.

Après trois cristallisations successives, le degré de pureté (activité/azote) des eaux mères atteint pratiquement celui du produit cristallisé.

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