

35. Contribution à l'étude de l' α -amylase de malt.

Sur les enzymes amylolytiques XVII¹⁾

par Ed. H. Fischer et C. H. Haselbach.

(21 XII 50)

Depuis les travaux de Märcker²⁾, Bourquelot³⁾, Wijsman⁴⁾ et surtout après les expériences de Kuhn⁵⁾ et Ohlsson⁶⁾, la plupart des auteurs⁷⁾ ont admis l'existence dans le malt de deux amylases différentes.

Pour pouvoir comparer les propriétés de l' α -amylase de malt pure d'une part à celle de la β -amylase de malt, et d'autre part à celles des α -amylases déjà obtenues à l'état pur et cristallisé, soit les α -amylases de pancréas de porc⁸⁾ de salive humaine⁹⁾, de pancréas humain¹⁰⁾ et de bactérie (*B. subtilis*)¹¹⁾, nous avons entrepris son isolement. Au cours de ce travail, Schwimmer & Balls ont annoncé la cristallisation de l' α -amylase du malt¹²⁾, alors que nous réussissions à en cristalliser la β -amylase (voir communication précédente). Dans leur méthode de purification, Schwimmer & Balls ont notamment utilisé une adsorption sélective de l'enzyme sur de l'amidon.

Après avoir constaté que cette méthode élégante ne pouvait pas s'appliquer à notre produit de départ habituel, le «Diastafor

¹⁾ Précédente communication, Helv. **34**, 316 (1951).

²⁾ M. Märcker, C. **1878**, 559.

³⁾ E. Bourquelot, C. r. **104**, 576 (1887); Ann. Inst. Pasteur **1**, 337 (1887).

⁴⁾ M. H. P. Wijsman, R. **9**, 1 (1890).

⁵⁾ R. Kuhn, B. **57**, 1965 (1924); A. **443**, 1 (1925).

⁶⁾ E. Ohlsson, C. r. lab. Carlsberg **16**, 7 (1926); Z. physiol. Ch. **189**, 17 (1930).

⁷⁾ G. A. van Klinkenberg, Z. physiol. Ch. **209**, 253 (1932); **212**, 173 (1932); G. Nordh & E. Ohlsson, Z. physiol. Ch. **204**, 89 (1932); H. Lüers & W. Rümmler, Wochenschr. f. Brauerei **50**, 297 (1933); **52**, 9 (1935); J. L. Teller, J. Biol. Chem. **114**, 425 (1936); J. Blom, A. Blak & B. Braae, Z. physiol. Ch. **241**, 273 (1936); **250**, 104 (1937); M. Samec & M. Blinc, Koll. Beihefte **49**, 75 (1939); C. S. Hanes, Canad. J. Research **13B**, 185 (1939); W. Z. Hassid & R. M. McCready, Am. Soc. **65**, 1157 (1943); R. H. Hopkins, R. H. Murray & A. R. Lockwood, Biochem. J. **40**, 507 (1940); R. H. Hopkins, B. Jelinek & L. E. Harrison, Biochem. J. **43**, 32 (1948); E. Kneen & R. M. Sandstedt, Cereal Chem. **18**, 237 (1941); E. Kneen, Cereal Chem. **21**, 304 (1944); K. Myrbäck & N. O. Johansson, Arkiv for Kemi **20A**, Nr. 6, 1 (1945).

⁸⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Exp. **3**, 106 (1947); Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv. **31**, 1831 (1948).

⁹⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, P. Bernfeld & A. Staub, Exp. **3**, 455 (1947); Helv. **31**, 2158 (1948).

¹⁰⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, P. Bernfeld & F. Duckert, Arch. Biochem. **18**, 203 (1948); Ed. H. Fischer, F. Duckert & P. Bernfeld, Helv. **33**, 1060 (1950).

¹¹⁾ K. H. Meyer, M. Fuld & P. Bernfeld, Exp. **3**, 411 (1947).

¹²⁾ S. Schwimmer & A. K. Balls, J. Biol. Chem. **179**, 1063 (1949).

Wander», nous l'avons utilisée avec succès en partant d'un extrait d'orge germée fraîchement préparé¹⁾.

Propriétés de l'enzyme pur.

Nature protéique. Comme *Balls* l'a constaté, l'enzyme présente les réactions habituelles des protéines. Il a une teneur de 13,4 % d'azote et moins de 0,01 % de phosphore.

Teneur en soufre. D'après *Proskuryakov* et coll.²⁾, l'enzyme contiendrait des groupes —SH qui seraient indispensables à l'activité enzymatique. Or, si effectivement les réactifs spécifiques des groupes —SH, tels que l'acide chloromercuri-4-benzoïque ou le chloromercuri-4-phénol, amènent une désactivation de l'enzyme, celle-ci se fait beaucoup plus lentement que sur la β -amylase (*Weill & Caldwell*³⁾). De plus nous n'avons pas réussi à constater une réactivation de l'enzyme par traitement par H_2S , KCN et cystéine.

Par contre, la réaction très sensible de *Chargaff*⁴⁾ pour les acides aminés contenant du soufre est restée totalement négative sur un hydrolysât de l'enzyme. Celui-ci contient donc moins de 0,05 % de soufre soit moins d'un mole de soufre par molécule d'enzyme (P.M. = 59.500⁵⁾), et l'on peut admettre que, comme pour les α -amylases animales, l' α -amylase de malt ne contient pas de soufre.

Activité en fonction du pH. L'enzyme est actif entre les pH 3,0 et 8,7 avec un palier correspondant à l'optimum d'activité entre pH 4,7 et 5,4. Ce palier n'apparaît qu'au cours de la purification comme l'indique la figure 1.

Activité en fonction de la température. L'optimum d'action se trouve entre 50 et 55° (fig. 2). L'énergie d'activation *A* a été calculée d'après *Arrhenius* selon l'équation:

$$\frac{d \ln k}{dt} = -\frac{A}{RT^2} \text{ qui par intégration donne}$$

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right),$$

où k_2 et k_1 représentent des constantes de vitesse de réactions aux températures T_2 et T_1 .

Nous n'avons pourtant pas exprimé la vitesse de la réaction par ces constantes car, particulièrement dans le cas des amylases, l'ordre de la réaction est très peu défini. En effet, lors de la scission d'une des liaisons α -1,4 glucosidiques reliant entre elles les restes de glucose

¹⁾ Nous remercions vivement M. le Prof. *A. K. Balls* de nous avoir fourni des cristaux d'amorçage.

²⁾ *N. I. Proskuryakov & A. A. Polyanskaya*, Doklady Akad. Nank. S. S. S. R. **61**, 487 (1948); C. A. **43**, 260 (1949).

³⁾ *C. E. Weill & M. L. Caldwell*, Am. Soc. **67**, 214 (1945).

⁴⁾ *E. Chargaff, C. Levine & C. Green*, J. Biol. Chem. **175**, 67 (1948).

⁵⁾ *S. Schwimmer & A. K. Balls*, J. Biol. Chem. **179**, 1063 (1949).

qui constituent la chaîne du polysaccharide, il se forme aux dépens d'une molécule de substrat primitive, deux nouvelles molécules qui,

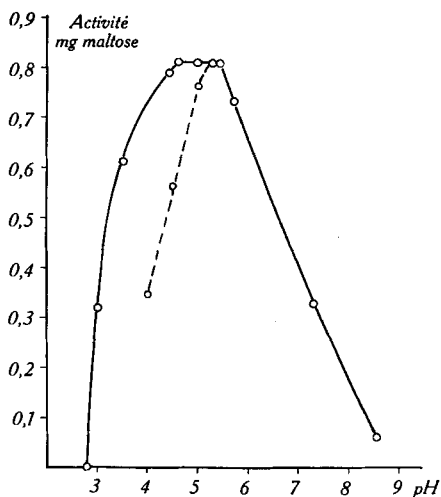


Fig. 1.

Activité de l' α -amylase de malt pure en fonction du pH
 —○— α -amylase pure, ---○--- α -amylase brute.

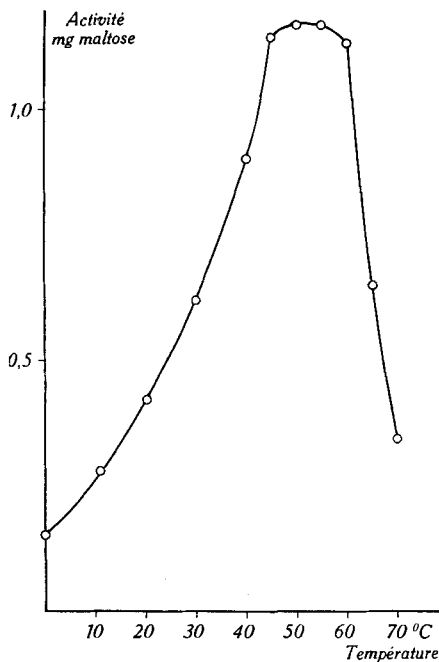


Fig. 2.

Activité de l' α -amylase de malt pure en fonction de la température (pH 5,3).

pouvant être à leur tour attaquées, constitueront deux nouvelles molécules de substrat. Ainsi, lors de chaque scission enzymatique, alors que le nombre total des liaisons glucosidiques et le poids moléculaire du substrat diminuent, le nombre même de ces molécules augmente.

Nous avons donc exprimé la vitesse de la réaction par la concentration des groupes réducteurs formés par minute, dans les conditions habituelles du dosage d'après

$$\ln \frac{v_2}{v_1} = \frac{A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right),$$

où v = mg maltose/min.

Nous avons également calculé la chaleur d'activation d'après les constantes des réactions, en donnant à k la valeur:

$$k = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x} \text{ pour une réaction monomoléculaire,}$$

où a = concentration initiale du substrat

$a-x$ = concentration du substrat au temps t .

En considérant avec *Ernström*¹⁾ que la vitesse de réaction devient beaucoup plus lente lorsque 75% du substrat ont été dégradés, nous avons donné à a une valeur égale à 75% de sa valeur réelle, comme s'il n'y avait que cette fraction du substrat qui puisse être utilisée.

Nous avons trouvé qu'entre 0 et 40° l'énergie d'activation de l' α -amylase de malt est de 7050 cal/mole (fig. 3) (8050 calculé selon *Ernström*¹⁾). La valeur de 12300 citée par *Sizer*²⁾ a été trouvée par *Ernström* pour l'«amylase de malt», c'est-à-dire pour un mélange d' α - et de β -amylase. Notre valeur de 7050 cal/mole est inférieure à

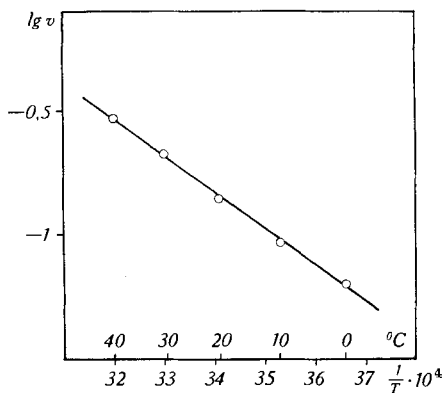


Fig. 3.

Logarithme de la vitesse de réaction de l' α -amylase de malt pure en fonction de l'inverse de la température absolue (calculée à partir de la courbe de l'activité en fonction de la température).

¹⁾ E. *Ernström*, Z. physiol. Ch. **119**, 190 (1922).

²⁾ I. W. *Sizer*, Adv. in Enzymol. **3**, 49 (1943).

l'énergie d'activation de 16500 trouvée pour l'amylase humaine cristallisée. Or, l'activité par unité de poids de l' α -amylase de malt est près de 3 fois inférieure à celle de l'amylase humaine pure. Cette contradiction s'explique par le fait que l'affinité de l'enzyme végétal pour le substratum est bien inférieure à celle de l'amylase animale¹⁾.

Entre 45° et 55°, l'activité reste pratiquement constante sans que ceci soit dû à une destruction de l'enzyme au cours du dosage. Effectivement, l'enzyme maintenu à 55° pendant des temps supérieurs à ceux du dosage, possède la même activité qu'au départ (dosage initial et final à 20°).

Activité en fonction de la teneur en sels. Les ions Cl' ne sont aucunement nécessaires à l'activité de l' α -amylase de malt, ce qui distingue cet enzyme des amylases animales. Par contre, comme l'a trouvé *Balls*, l' α -amylase de malt est totalement inactive en l'absence de Ca⁺⁺. Les solutions d'enzyme seront donc désactivées par toutes les substances déplaçant les ions Ca⁺⁺ en solution.

Nous avons étudié l'action du «Complexon II» (acide éthylène-diamine-tétracarboxylique) sur les solutions d'enzyme. A pH 6 l'enzyme est totalement désactivé après 30 min. dans une solution de «Complexon II» 0,05-m. On peut réactiver 80 % de l'amylase par dialyse contre une solution saturée de SO₄Ca. Comme nous avons constaté que la β -amylase de malt n'est pas désactivée par le «Complexon II» (l'ion Ca⁺⁺ n'étant pas nécessaire à son activité) nous avons pensé que cette méthode nous permettrait de doser séparément ces deux enzymes dans les extraits de malt. Malheureusement, nous avons trouvé que dans un tel extrait, il semble n'y avoir aucune désactivation de l' α -amylase de malt, même en présence d'un grand excès de «Complexon II». Nous ne savons pas exactement comment s'effectue cette action protectrice de l'enzyme, par les autres substances présentes.

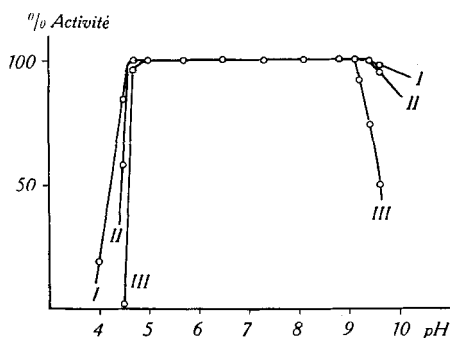


Fig. 4.

Stabilité de l' α -amylase pure à 25° en fonction du pH

I après 30 minutes. II après 2 heures. III après 18 heures.

¹⁾ P. Bernfeld & H. Studer-Pécha, *Helv.* **30**, 1904 (1947).

Stabilité. Les solutions aqueuses de l' α -amylase de malt pure sont très stables. Aucune perte d'activité n'est constatée à 25° entre pH 4,9 et 9,1. On peut garder sans désactivation des cristaux d' α -amylase de malt pendant plus d'une année lorsqu'ils sont suspendus dans une solution de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à 0,6 de saturation.

Solubilité. Contrairement aux amylases animales, l' α -amylase de malt est extrêmement soluble dans l'eau (solubilité $> 10\%$ à pH 6). Il est impossible de cristalliser l'enzyme à partir d'une solution aqueuse en l'absence de sels.

Point isoélectrique. Il est situé au pH $5,70 \pm 0,1$. Dans la figure 5 on trouvera la mobilité électrophorétique de l'enzyme en fonction du pH du côté alcalin du point isoélectrique.

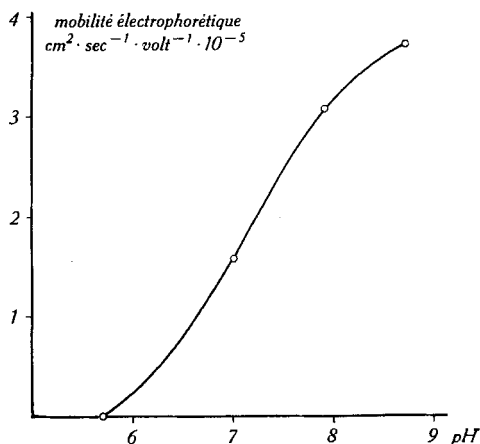


Fig. 5.

Mobilités électrophorétiques de l' α -amylase de malt en fonction du pH.

Le spectre d'absorption. Comme pour les α -amylases animales, le spectre d'absorption de l' α -amylase de malt dans l'ultraviolet présente un maximum à 280 $\text{m}\mu$ et un point d'inflexion à 292 $\text{m}\mu$.

Comparaison de l' α -amylase de malt avec l' α -amylase humaine. Le tableau 1 résume et compare les principales propriétés de l' α -amylase de malt avec celles de l' α -amylase humaine.

L' α -amylase de malt pure possède un quotient d'activité par azote de 2300, contre 6400 pour l' α -amylase humaine, 4000 pour l' α -amylase de porc et 3600 pour l' α -amylase de bactérie. Comme les amylases humaines, elle ne contient ni P ni S, et possède pratiquement le même spectre d'absorption dans l'ultraviolet. Par contre, elle se distingue nettement des amylases humaines par son optimum de pH d'action, sa stabilité en fonction du pH, son énorme solubilité dans l'eau à pH ≤ 7 et son activation par l'ion Ca^{++} . Enfin le quotient

pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène étant identique à celui des autres α -amylases, l' α -amylase de malt doit posséder la même action enzymatique sur les composants de l'amidon, quoiqu'elle soit chimiquement différente.

Tableau 1.

	α -amylase de malt	α -amylase ¹⁾ humaine
Activité par mg d'azote	2350 mg maltose	6400 mg maltose
Teneur en azote	13,4% ²⁾	15,8%
Teneur en P	0,01% ²⁾	0,01%
Teneur en S	< 0,05%	0%
pH optimum d'action	4,7–5,4	6,9
Stabilité en fonction du pH	4,9–9,1	4,5–11
Energie d'activation entre 10° et 30° .	7050 cal/mole.	16500 cal/mole.
Solubilité dans l'eau à 2°C et à pH 7 .	> 10%	0,23%
Mobilité électrophorétique à pH 7,9 .	$3,1 \cdot 10^{-5}$ cm ²	$3,1 \cdot 10^{-5}$ cm ²
(tamp. vér.-acét. $\mu = 0,1$)	sec. ⁻¹ volt ⁻¹	sec. ⁻¹ volt ⁻¹
Spectre d'absorption		
Maximum	280 m μ ²⁾	280 m μ
Point d'inflexion	292 m μ ²⁾	292 m μ
Quotient $\frac{\text{pouvoir saccharogène}}{\text{pouvoir dextrinogène}}$	$9,8 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,2$
Activation par Cl'	—	+
Activation par Ca ⁺⁺	+ ²⁾	—

Partie expérimentale.

Dosage d'activité. On dose l'enzyme en laissant agir 1 cm³ de sa solution pendant 3 min. à 20° sur 1 cm³ d'une solution d'amidon *Zulkowsky* à 1%, tamponnée à pH 5,3 (acide acétique-acétate 0,1-m.). Les groupes réducteurs ainsi formés sont dosés colorimétriquement par l'acide dinitro-3,5-salicylique³⁾. L'activité de l'enzyme est exprimée en mg de maltose formés dans les conditions du dosage; son degré de pureté par le quotient mg maltose/mg azote *Kjeldahl*.

Préparation de l'extrait d'orge germé. 1 kg d'orge (*Isaria*) est soigneusement lavé à l'eau courante, puis trempé pendant 48 h. dans l'eau pour que les grains puissent gonfler. On place ensuite les grains dans une marmite pour les laisser germer. Pour que la germination se fasse régulièrement, on les transvasera 2 fois par jour dans un autre récipient tout en les remuant délicatement pour ne pas briser les germes. La germination est terminée après 4 jours à 20°. Les grains germés sont ensuite suspendus dans 2 l d'eau et broyés pendant 5 min. par petites portions dans un «Waring Blendor». L'extrait est centrifugé, puis purifié selon *Schwimmer & Balls*²⁾.

Fractionnement de l'extrait.

Stade I. 1800 cm³ de l'extrait brut trouble de pH 6,3 sont portés dans une marmite en aluminium et sous lente agitation à 70°, puis maintenus pendant 10 min. à cette tem-

¹⁾ P. Bernfeld, F. Duckert & Ed. H. Fischer, *Helv.* **33**, 1064 (1950).

²⁾ S. Schwimmer & A. K. Balls, *J. Biol. Chem.* **179**, 1063 (1949).

³⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 64 (1947).

pérature. Sans refroidir, on ajoute 20 g de «Celite» et filtre sur un grand Buchner. On recueille 1770 cm³ d'un filtrat brun, limpide, qu'on refroidit entre 0 et 10°. Activité totale: 175000 mg maltose, degré de pureté 40 à 60 mg maltose/mg d'azote.

Stade II. On ajoute au filtrat précédent 570 g de sulfate d'ammonium solide, rajuste le pH qui tombe lors de cette addition à 5,4, et continue l'agitation pendant 2 h. On ajoute 10 g de «Celite» et filtre. On rince le produit sur le filtre avec 50 cm³ d'une solution à 0,4 de saturation en sulfate d'ammonium, puis on l'essore. Le gâteau est suspendu dans 50 cm³ d'une solution saturée en CaSO₄ et on élimine la «Celite» par filtration. On obtient 59 cm³ d'une solution brune, foncée, contenant une activité de 76000 mg maltose et présentant un degré de pureté de 160 mg maltose/mg N. Rendement en activité: 40%, enrichissement de 3 à 4 fois.

Stade III. On ajoute aux 59 cm³ obtenus 59 cm³ de méthanol à 80 vol.-% centrifuge le sulfate de calcium qui cristallise et verse la liqueur sur une colonne à chromatographier de 4 cm de diam., contenant un mélange homogène de 40 g de Filter-cel et 40 g d'amidon de maïs dégraissé (remplissage à sec). La colonne est soumise à un faible vide. On la lave ensuite avec environ 150 cm³ d'une solution de méthanol à 40% contenant 2 g/l de CaCl₂ jusqu'à ce que la solution reste incolore, ce qui est indispensable pour permettre la cristallisation de l'enzyme dans l'éluat. On élue l'enzyme par de l'eau distillée en recueillant des fractions d'environ 30 cm³ sur lesquelles on dose successivement et l'activité enzymatique et l'absorption dans l'ultraviolet. On réunit et garde pour la cristallisation les fractions qui possèdent un quotient activité/100 log extinction ≥ 2 (mesuré au *Beckman* à 280 m μ , cuve de 1 cm). Rendement total en activité dans l'éluat: 70 à 80%. Activité dans les fractions que l'on garde: 35000 mg maltose, soit 55% de la totalité. Degré de pureté: env. 1800 mg maltose/mg N.

Stade IV. Les fractions réunies (96 cm³) sont additionnées de 43 g de sulfate d'ammonium solide, agitées pendant 30 min. puis filtrées en présence d'env. 1 g de Filter-cel. Le précipité est suspendu dans 8 cm³ d'une solution demi-saturée en sulfate de calcium, on filtre et rince le filtre avec 2 cm³ de la même solution.

Cristallisation et recristallisation. Le filtrat limpide et incolore (pH 5,4) est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'au premier trouble, puis le pH est ajusté à 5,9—6,0 par NH₄OH 0,1-n. On élimine le premier trouble par centrifugation et abandonne la liqueur surnageante limpide dans un dessiccateur, sous un faible vide et en présence de silicagel, à 30° et sous lente agitation. Après 48 h., on centrifuge la suspension contenant en plus des cristaux d'amylase de l' α -amylase sous forme de précipité amorphe, ainsi que des produits dénaturés. Le culot est repris dans environ 3 cm³ d'eau, on élimine les produits dénaturés insolubles par centrifugation et rajoute à la liqueur limpide une solution saturée en sulfate d'ammonium et de calcium de pH 6,0 (préparée en dissolvant le sulfate d'ammonium dans une solution préalablement saturée en sulfate de calcium). Cette solution est mise à cristalliser comme précédemment.

Après une recristallisation de l'enzyme, on n'obtient guère plus de 10 mg de produit cristallisé d'un degré de pureté de 2300 mg maltose/mg N, en partant d'un kilo d'orge. Il faut au moins recristalliser le produit 3 fois de suite pour obtenir des cristaux qui ne soient pas accompagnés de matériel amorphe.

Recherches sur les groupes —SH.

1. *Action de l'acide chloromercuri-4-benzoïque (I).* On dissout 712 mg (0,002-m) de I dans 100 cm³ d'eau qu'on neutralise par 2 cm³ de NaOH-n. On fait agir à 20° 1 cm³ de cette solution sur 1 cm³ d'une solution d'enzyme à 1400 mg maltose/cm³ en présence de 8 cm³ d'un tampon acétate 0,2-m. de pH 5,3. On dose l'activité en prélevant des prises de 10 en 10 min. On répète les mêmes essais avec des solutions 10 et 100 fois plus diluées en I.

2. *Essais de réactivation sur les produits partiellement désactivés par I.* Les solutions d'enzyme ayant perdu env. 80% de leur activité (après un contact de 180 min. avec I)

sont additionnées d'un même volume d'une solution saturée en H_2S , de cystéine ou KCN 0,1-n. (solution ajustée à pH 5,3). On dose l'activité sur les prises effectuées de 10 en 10 min. L'hydrogène sulfuré, la cystéine ou le KCN gênant les dosages d'activité par la méthode colorimétrique à l'acide dinitro-3,5-salicylique, nous avons dû appliquer la méthode de *Bernfeld-Fuld*¹⁾ basée sur la coloration que prend l'amidon avec l'iode à différents degrés de dégradation. Il faut évidemment oxyder l'excès des adjuvants par un excès d'iode avant que la coloration n'apparaisse.

Dans un autre essai nous avons éliminé l'excès d' H_2S en congelant, puis en sublimant au vide poussé la solution à la fin du dosage, après avoir bloqué la réaction enzymatique par 2 cm³ d'ac. acétique normal.

3. *Hydrolyse de la protéine pour le dosage des groupes —SH*. 10 mg d'enzyme cristallisée sont additionnés de 3 cm³ de HCl 6,7-n. dans un tube que l'on scelle. Le tube est placé 24 h. à 117°, refroidi et la solution brunâtre concentrée au vide en présence de KOH. Le résidu est repris dans 1 cm³ d'eau et de nouveau concentré à sec, puis redissous dans 0,2 cm³ d'eau. On effectue la recherche des groupes —SH sur cette solution en appliquant la méthode qualitative de *Chargaff*²⁾, qui consiste à examiner la décoloration d'une solution d'iode en présence d'azide de sodium, décoloration fortement catalysée par la présence d'acides aminés contenant des groupes —SH.

Les activités en fonction du pH et de la température, et la stabilité de l'enzyme en fonction du pH ont été étudiées de la même manière que pour l' α -amylase de salive³⁾. Il faut cependant éviter l'emploi de tampons pouvant fixer l'ion Ca^{++} , comme c'est le cas pour les tampons citrates et glycocholate. Les mobilités électrophorétiques ont été déterminées comme précédemment décrit⁴⁾.

Activité en présence de Ca^{++} .

10 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 150 mg maltose/cm³ sont additionnés de 10 cm³ d'une solution de «Complexon II» 0,1-m., pH 6. On dose l'activité de 5 en 5 min. sur des prises aliquotes. Après désactivation totale, la solution restante est soumise à une dialyse contre une solution saturée en $CaSO_4$ qu'on changera plusieurs fois. La dialyse est interrompue après 62 h. et l'on dose l'activité en tenant compte de l'augmentation du volume de la solution survenue au cours de ce traitement.

Nous exprimons à M. le Professeur *Kurt H. Meyer* notre vive reconnaissance pour ses conseils et l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail.

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

RÉSUMÉ.

Les propriétés de l' α -amylase de malt cristallisée ont été étudiées.

Malgré une désactivation par des composés chloromercuriels organiques spécifiques des groupes —SH, l' α -amylase de malt ne contient pas de soufre. Cette particularité rapproche donc cet enzyme des α -amylases animales.

Par contre, son optimum d'action entre pH 4,7 et 5,4, son point isoélectrique à pH 5,7 et sa très grande solubilité dans l'eau à pH 7 l'en distinguent nettement.

¹⁾ *P. Bernfeld & M. Fuld*, *Helv.* **31**, 1420 (1948).

²⁾ *E. Chargaff* et coll., *J. Biol. Chem.* **175**, 69 (1948).

³⁾ *P. Bernfeld, A. Staub & Ed. H. Fischer*, *Helv.* **31**, 2165 (1948).

⁴⁾ *Ed. H. Fischer, F. Duckert & P. Bernfeld*, *Helv.* **33**, 1069 (1950).

Son activité par unité de poids est bien inférieure à celle des amylases animales. Ceci provient de ce que son affinité pour le substratum est faible. Par contre, son énergie d'activation de 7050 cal/mole entre 0 et 45° ne représente que les 43 % de celle des amylases animales.

Enfin, l'ion calcium est indispensable à l'activité de l' α -amylase de malt. L'enzyme désactivé lorsqu'on complexe l'ion Ca^{++} par différents réactifs peut être réactivé par addition de cet ion. L'ion Ca^{++} semble donc jouer le même rôle dans l' α -amylase de malt que l'ion Cl^- dans les α -amylases animales.

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

36. Synthèses d'époxydes hydroaromatiques VIII¹⁾. Anhydride de l'hydroxy-3-tétrahydro-ionone

par M. Stoll et M. Hinder.

(21 XII 50)

Dans un précédent travail²⁾, l'un de nous, en collaboration avec *L. Ruzicka & C. F. Seidel*, a montré qu'on pouvait préparer l'anhydride de l'hydroxy-3-tétrahydro-ionone (VIII) en cyclisant la cyanhydrine de la dihydro-ionone- α au moyen d'un mélange d'acide sulfurique concentré et d'acide acétique, et en éliminant ensuite le groupe nitrile par saponification et décarboxylation électrolytique.

La réduction des époxydes-1,2 au moyen du LiAlH_4 ³⁾ offrait une nouvelle façon de préparer cette substance. Et puisque la réaction avait lieu en milieu alcalin, elle devait peut-être même permettre d'aboutir à son isomère stérique. Toutefois, la réussite de cette synthèse dépendait de la possibilité de préparer l'époxyde-3,4 du cétal de la dihydro-ionone- α (III). Or, cette préparation est parfaitement possible si on transforme la dihydro-ionone (I) d'abord en éthylène-cétal II et ensuite seulement en époxyde III⁴⁾. L'éthylène-cétal II est suffisamment stable pour supporter le traitement à l'acide perchlorique sans scission appréciable en cétone et glycol.

¹⁾ Communication VI, *Helv.* **33**, 1515 (1950). La communication «Odeur et constitution IV», *Helv.* **33**, 1308 (1950), constitue en même temps la communication VII de cette série.

²⁾ Communication III, *Helv.* **33**, 1245 (1950).

³⁾ *Pl. Plattner, H. Heusser & A. B. Kulkarni*, *Helv.* **31**, 1885 (1948).

⁴⁾ Il n'est pas possible de faire d'abord l'époxyde et ensuite la cétalisation.