

136. Purification de l'invertase de levure

par Ed. H. Fischer et Laure Kohtès¹⁾.

(27 IV 51)

La purification de l'invertase a déjà fait l'objet d'un très grand nombre de travaux rapportés dans plusieurs centaines de publications²⁾. Mais aucune méthode n'a encore permis l'obtention d'un produit pur. La principale difficulté provient toujours de ce que l'invertase semble être liée à des polysaccharides ou accompagnée de ces corps qui modifient totalement ses propriétés chimiques au point qu'on ne peut plus appliquer à sa purification les procédés classiques utilisés pour le fractionnement des protéines. Dans la plupart des cas, on ne peut précipiter l'invertase par des solutions salines à saturation et elle ne donne que des produits huileux en présence de solvants organiques. Aussi, en 1924, Willstätter et coll. ont-ils émis des doutes sur la nature protéique de l'enzyme.

A part quelques essais de précipitation de l'invertase par de l'alcool³⁾, par de l'acétate de plomb⁴⁾, la presque totalité des méthodes de purification fait appel à des adsorptions sélectives de l'enzyme sur une grande variété d'adsorbants. Signalons l'emploi de sulfate ferrique basique ou d'hydroxyde de fer⁵⁾ plus ou moins finement divisé⁶⁾, d'hydroxyde d'aluminium⁷⁾, de phosphate de plomb⁸⁾, d'hydroxyde de strontium⁹⁾ notamment en présence d'acétate d'uranyle¹⁰⁾, de sulfure de zinc¹¹⁾, etc.

Lutz & Nelson¹²⁾ après avoir laissé vieillir l'autolysat, le précipitent par de l'alcool, puis adsorbent l'enzyme sur du kaolin. Ils obtiennent ainsi une invertase fortement enrichie qui, en général, est soluble dans le sulfate d'ammonium à saturation.

Adams & Hudson¹³⁾ adsorbent directement l'enzyme sur de la bentonite après l'avoir dialysé et laissé vieillir pendant une semaine environ. Le produit obtenu contiendrait

¹⁾ Lauréate du «Concours interuniversitaire du Gouvernement Belge pour des Bourses de voyage».

²⁾ Voir la monographie de C. Neuberg & I. S. Roberts, «Invertase», Scient. Report n° 4, Sugar Res. Found (1946).

³⁾ C. O'Sullivan & F. Tompson, Soc. 57, 834 (1890); H. v. Euler & K. Josephson, B. 56, 446 (1923); R. Willstätter & K. Schneider, Z. physiol. Chem. 133, 193 (1924).

⁴⁾ F. Hofmeister, Z. physiol. Chem. 2, 288 (1878).

⁵⁾ P. Cornette, Ch. Z. 22, Repertorium, 79 (1898).

⁶⁾ L. Michaelis & P. Rona, Bioch. Z. 7, 329 (1907); 8, 356 (1908); 16, 60 (1909).

⁷⁾ L. Michaelis & M. Ehrenreich, Bioch. Z. 57, 70 (1913); L. Michaelis, Bioch. Z. 7, 488 (1908); 10, 283 (1908); L. Michaelis & P. Rona, Bioch. Z. 25, 359 (1910); 115, 269 (1921); H. Albers & I. Meyer, Z. physiol. Chem. 228, 122 (1934); R. Weidenhagen, Z. Ver. deutsch. Zuckerind. 86, 473 (1936).

⁸⁾ R. Willstätter, K. Schneider & E. Wenzel, Z. physiol. Chem. 151, 1 (1926).

⁹⁾ R. Weidenhagen, Z. Ver. deutsch. Zuckerind. 86, 473 (1936); R. Weidenhagen & L. Nenninger, ibid. 89, 149 (1939).

¹⁰⁾ R. Willstätter, Enzyme (1928), p. 589; E. Kritschewskaja, Bioch. Z. 272, 348 (1934).

¹¹⁾ N. K. Richtmyer & C. S. Hudson, Am. Soc. 60, 983 (1938).

¹²⁾ J. G. Lutz & J. M. Nelson, J. biol. Chem. 107, 169 (1934).

¹³⁾ M. Adams & C. S. Hudson, Am. Soc. 65, 1359 (1943).

14,8% d'azote, précipiterait par addition de sulfate d'ammonium ou des acides picroique, picrolonique ou flavianique et ne contiendrait pas plus de 7% d'hydrates de carbone.

Les résultats de *Hudson* semblent en contradiction avec ceux de *H. Dieu* et de *Sumner*. Le premier¹⁾ décrit une purification d'invertase de levure de boulangerie par de l'alcool ou de l'acétone qui lui aurait permis d'obtenir des solutions d'un degré de pureté supérieur à ceux mentionnés dans la littérature après un enrichissement de 50 fois environ par rapport à l'azote de l'extrait brut. Mais ces préparations contiennent encore une quantité importante de polysaccharides²⁾.

Enfin, *Sumner*³⁾ montre que l'invertase purifiée 1500 à 2500 fois, par double adsorption sur du phosphate tricalcique, précipite par la concanavaline A, et il admet que l'enzyme serait un complexe polysaccharide-protéine.

La plupart des auteurs utilisèrent le «*time value*»⁴⁾ pour exprimer le degré de pureté de leurs produits, c'est-à-dire le temps (en minutes) nécessaire pour annuler la rotation d'une solution de saccharose à 16% lorsqu'on la met en présence de 50 mg d'enzyme à 15°. La rotation zéro correspondant à une hydrolyse de 75,75% de saccharose, cette méthode, comme le signale *H. Dieu*¹⁾, ne fournit aucune indication sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique, et son emploi pour exprimer la pureté des produits est sujet à caution. On ne peut en aucun cas comparer les valeurs ainsi obtenues à celles fournies par les méthodes réductométriques se rapportant à la phase initiale de la réaction enzymatique.

Il nous a semblé intéressant de reprendre l'étude de l'invertase et, à cet effet, nous avons entrepris la purification de l'invertase de levure de boulangerie. Nous avons cherché à réaliser un enrichissement aussi grand que possible par rapport à l'azote et aux polysaccharides contenus dans l'extrait brut. Nous avons enfin répété la purification selon *Adams & Hudson* afin de voir si leur méthode nous permettrait d'éliminer tous les polysaccharides présents dans notre matériel de départ.

Dosage de l'invertase. L'activité de l'invertase a été dosée d'après une modification de la méthode colorimétrique de *Sumner*⁵⁾ à l'acide dinitro-3,5-salicylique.

L'unité d'invertase (activité: A) est la quantité d'enzyme qui libère 1 mg de sucre réducteur (glucose + fructose) en 3 min. à 20,0°, pH 4,8, à partir d'une solution de saccharose à 5%. Lors des dosages, la quantité d'enzyme doit être telle que la dégradation du substrat ne dépasse pas 3%.

Le degré de pureté de l'enzyme a été exprimé par le quotient de l'activité soit par rapport à l'azote *Kjeldahl* (A/mg N) soit par rapport aux hydrates de carbone (A/mg S) calculés en glucose. Les enrichissements sont rapportés aux valeurs trouvées dans l'extrait brut.

Préparation d'une poudre sèche. Nous avons d'abord songé à préparer une poudre sèche afin d'avoir un matériel plus commode et plus

¹⁾ *H. A. Dieu*, Bl. Soc. Chim. Belg. **55**, 306, 327 (1946).

²⁾ *E. Gorter & H. A. Dieu*, Proc. Kon. nederl. Akad. Wetensch. **50**, 325 (1947).

³⁾ *J. B. Sumner & D. J. O'Kane*, Enzymologia **12**, 251 (1948).

⁴⁾ *C. O'Sullivan & F. W. Tompson*, Soc. **57**, 834 (1890); *R. Willstätter & R. Kuhn*, B. **56**, 68 (1923); *R. Willstätter & F. Racke*, A. **425**, 1 (1921—1922).

⁵⁾ *J. B. Sumner & S. F. Howell*, J. Biol. Chem. **108**, 51 (1935).

constant en vue de la purification. Différents procédés ont été utilisés comportant l'introduction de la levure dans des solvants préalablement portés à -20° , mais nous avons constaté que lors de l'extraction de cette poudre sèche, le rendement en invertase reste faible tant que la levure n'a pas été soumise à une plasmolyse suivie d'une autolyse avant sa dessiccation. Pourtant, même en procédant ainsi, le rendement le meilleur obtenu ne dépasse pas 70 % de ce que l'on obtient par extraction directe. Aussi avons-nous renoncé à cette préparation.

Extraction directe de l'invertase à partir de la levure fraîche. La mise en solution comprend une plasmolyse rapide au cours de laquelle les cellules éclatent, suivie d'une autolyse qui libère l'invertase. Un nombre considérable de procédés sont rapportés dans la littérature, utilisant toute une série d'agents pour provoquer la plasmolyse des cellules¹⁾. Des écarts importants dans les rendements en invertase ayant été constatés selon le traitement choisi, nous avons établi les conditions optimum pour effectuer cette extraction. Mais même dans ces conditions, on constate de grandes variations selon les pains de levure utilisés.

Contrairement aux indications de *Salkowski*²⁾, un traitement rapide de notre levure par de l'eau à 5 % de CHCl_3 n'entraîne aucune élimination notable des gommes et ne facilite en rien la séparation des polysaccharides. De même avons-nous abandonné l'autolyse fractionnée préconisée par *Willstätter*: si elle permet effectivement de rejeter après 3 h. d'autolyse une solution ne contenant guère plus de 10 % de l'invertase, la quantité d'hydrates de carbone ou d'autres impuretés qu'on peut éliminer ainsi n'est pas suffisante pour justifier une centrifugation supplémentaire.

La plasmolyse a été provoquée soit par du toluène, soit par des sels. L'autolyse par contre doit toujours être effectuée en présence de toluène. Si l'on n'en rajoute pas après plasmolyse par les sels, guère plus de 15 % de l'enzyme sont libérés, ce qui semble indiquer une action chimique propre au solvant, évent. sur les lipoïdes cellulaires. La quantité d'invertase mise en solution atteint un maximum après 60 h. alors que les polysaccharides s'extraient plus lentement. Lorsqu'on prolonge l'autolyse, le rendement en invertase baisse légèrement. La fig. 1 montre la quantité d'invertase et d'hydrates de carbone qui passent en solution au cours de l'autolyse.

Le pH qu'il faut maintenir dépend essentiellement du procédé utilisé pour la plasmolyse. Lorsqu'on plasmolyse la levure par le toluène, l'autolyse peut s'effectuer indifféremment à des pH compris entre 5 et 7,5. Lorsqu'on la plasmolyse par des sels, il est indispen-

¹⁾ *v. Wittich*, *Pflügers Arch.* **2**, 193 (1869); **3**, 339 (1870); **5**, 435 (1872); *F. Hoppe-Seyler*, *B.* **4**, 810 (1871); *E. Salkowski*, *Z. physiol. Chem.* **13**, 506 (1889); **31**, 305 (1900-1); **61**, 124 (1909); *B. Kisch*, *Bioch. Z.* **40**, 152 (1912).

²⁾ *E. Salkowski*, *Z. physiol. Chem.* **31**, 305 (1900-1); **61**, 124 (1909).

sable de maintenir le pH au cours de l'autolyse au-dessus de 6. Le meilleur résultat s'obtient par une plasmolyse à l'acétate de sodium. Un barbotage d'air ou une agitation mécanique ne favorisent en rien la mise en solution de l'invertase.

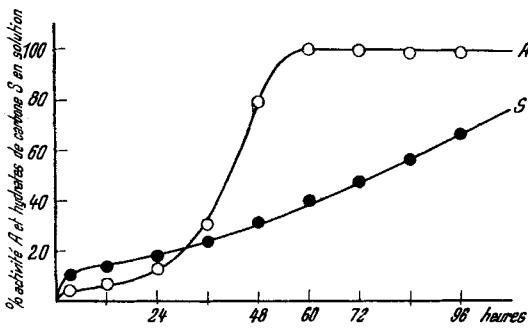


Fig. 1.

Mise en solution de l'invertase (—○—) et des polysaccharides (—●—) en fonction du temps d'autolyse, à 37° et pH 6,2.

L'extrait brut est parfaitement stable s'il est conservé à froid. Par acidification, l'invertase reste en solution et ne se désactive qu'aux environs du pH 2. Elle est détruite par les acides trichloracétique ou phosphotungstique et on ne peut la précipiter par addition de sels ou de solvants. L'acétone, le dioxane ou l'éthanol provoquent, après élimination d'un faible culot, la formation d'une huile contenant tout l'enzyme à peine enrichi. Le tétrahydro-furfurol désactive 70 % de l'invertase, et l'alcool méthylique plus de 90 %, même à des températures de —20°. L'acétate basique de plomb détruit en partie l'enzyme, les reineckates et les tanins sont sans effet et n'entraînent aucune précipitation.

Par contre, un traitement à l'acide picrique permet de précipiter 80 % de l'azote protéique présent alors que l'invertase reste en solution. Une précipitation acétonique permet ensuite de séparer l'enzyme sous forme d'une huile qu'on dialyse pour éliminer les dernières traces d'acide picrique.

La solution obtenue est relativement limpide, peu colorée, et ne présente pas les caractères d'une solution de protéine. Elle ne se trouble pas après 10 min. d'ébullition et ne subit aucune désactivation par traitements prolongés selon *Sevag*. Une analyse montre qu'elle contient au maximum 10 % de protéine et plus de 90 % de polysaccharides. Pour éliminer ceux-ci, nous avons cherché à adsorber sélectivement l'invertase. Des essais ont été effectués avec différents adsorbants: oxydes ou hydroxydes d'aluminium, phosphates di- et tri-calciques, cellulose pulvérisée humide et amidon de maïs, soit directement, soit sur colonnes à chromatographier, en solution aqueuse ou acétonique.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en adsorbant l'enzyme sur de l'hydroxyde d'aluminium fraîchement précipité; on peut éliminer ainsi en une fois 80% des polysaccharides avec un rendement pratiquement quantitatif en invertase. Cette opération permet de plus d'éliminer la presque totalité des protéines inactives encore présentes à ce stade.

L'étude systématique des facteurs influençant cette adsorption nous a permis de déterminer les conditions les meilleures pour adsorber totalement l'invertase en entraînant le minimum de polysaccharides. Ce sont: une température de 0°, un temps d'adsorption de 3 min. (fig. 2), un pH de 6,0 (fig. 3), et une concentration d'enzyme de 40 à 60 A/cm³.

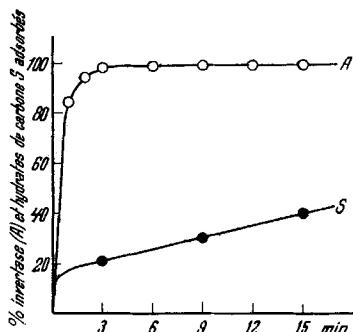


Fig. 2.

Adsorption comparative de l'invertase (—○—) et des polysaccharides (—●—) sur Al(OH)_3 au cours du temps. Conc. d'enzyme 50 A/cm³, pH 6,0.

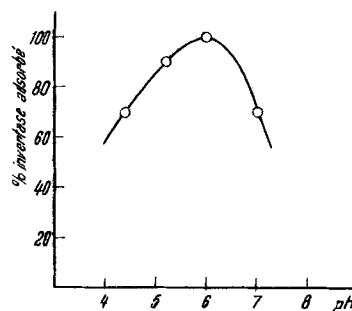


Fig. 3.

Adsorption de l'invertase sur Al(OH)_3 en fonction du pH. Conc. d'enzyme 50 A/cm³, après 3 min.

La quantité optimum d'hydroxyde à employer par unité d'enzyme varie par contre d'une préparation à l'autre. Il sera donc indispensable de déterminer sur une prise et pour chaque préparation la quantité minimum d'hydroxyde à mettre en jeu. L'invertase une fois adsorbée sur l'hydroxyde présente la même activité que lorsqu'elle se trouve en solution. Ceci indique que le ou les sites par l'intermédiaire desquels l'enzyme se combine à l'adsorbant sont différents de ceux qui interviennent lors de la formation du composé d'addition enzyme-substratum. L'invertase une fois adsorbée ne peut être élueée ni par de l'eau, ni par des solutions salines à des pH supérieurs à 6. Par contre, on peut l'éluer, quoique lentement, par des phosphates primaires ou, beaucoup plus rapidement, en établissant le pH de la suspension entre 2,6 et 3,5. L'emploi d'un tampon lactique de pH 2,9 libère quantitativement l'invertase en 15 à 20 min. à température ordinaire, alors qu'à peine 15% de l'hydroxyde se sont dissous.

En répétant toute l'opération, on peut éliminer env. 95 % des polysaccharides présents dans l'extrait brut, tout en réalisant un excellent enrichissement par rapport à l'azote. Une répétition de ces adsorptions ne permet toutefois pas de dépasser l'enrichissement indiqué. La solution obtenue possède un degré de pureté de 4000 A/mg N (env. 600 A/mg protéine) et de 200 à 250 A/mg S. L'enzyme contient donc toujours de 70 à 80 % de polysaccharide.

Pour éliminer le reste des polysaccharides, nous avons essayé de modifier complètement les conditions d'adsorption et cherché soit à empêcher l'adsorption des sucres, soit au contraire à adsorber ceux-ci sans adsorber l'enzyme. Nous avons donc travaillé en présence de cations alcalino-terreux (pour bloquer évent. des groupes hydroxyles libres de restes phosphoriques présents sur le polysaccharide), d'ac. borique (pour modifier évent. les caractères du polysaccharide) ou d'ac. picrique (pour modifier l'adsorption de la protéine). Tous ces essais sont restés négatifs¹⁾.

Le tableau ci-dessous résume les rendements en activité, et degrés de pureté obtenus à chaque stade de cette purification. L'enrichissement qu'on obtient au cours de la première ou de la seconde adsorption peut varier, mais le produit final atteint toujours le même degré de pureté.

Opération	Rendements rapportés		Degrés de pureté	
	au stade précédent.	à l'extr. brut	A/mg N	A/mg S
Extrait brut	100	100	20	10
Précip. picrique	80	80	150	20
Précip. acétonique et dialyse . . .	90	72	150	20
Adsorpt. Al(OH) ₃	97	70	400	55
Elution	90	63	2800	97
Précip. acétonique	95	60	2800	97
2e adsorpt., élut. et précip. acétonique	85	50	4000	250

On obtient ainsi à partir de 5 pains de levure (2 kg 500) avec un rendement total d'env. 50 % et un enrichissement de 200 fois par rapport à l'azote et de 25 fois par rapport aux sucres, env. 700 000 unités d'invertase représentant 1,2 g de protéine et 3 g de polysaccharide.

Contrairement aux produits moins purs, l'invertase purifiée peut être séchée par congélation, puis sublimation de la glace au vide. La poudre sèche contient 4 à 5 % d'azote (*Kjeldahl*) représentant env. 30 % de protéine et 70 % de polysaccharide. Elle peut contenir en outre de 0,1 à 0,5 % de phosphore.

¹⁾ Voir communication suivante.

Purification de l'invertase selon Adams & Hudson¹). Nous avons répété, sur notre levure, la purification d'après laquelle *A. & H.* auraient obtenu un enzyme dépourvu de polysaccharide.

Nous avons scrupuleusement suivi leur prescription, en faisant varier la durée de la dialyse et celle du vieillissement de la solution dialysée pour nous placer dans les conditions optimum requises. Nous avons utilisé pour l'adsorption deux des bentonites indiquées (KWK Volclay et 200 mesh Volclay²).

En aucun cas nous n'avons pu obtenir un produit dépourvu de polysaccharide. Le degré de pureté maximum atteint, par rapport aux polysaccharides, fut parfois de l'ordre de celui fourni par notre méthode (200 A/mg S). Par contre, l'enrichissement par rapport à l'azote fut toujours de beaucoup inférieur.

Conclusion.

La purification rapportée nous a probablement permis d'obtenir une invertase d'un degré de pureté supérieur à ce qui a été mentionné jusqu'à présent dans la littérature. Le produit est 4 fois plus pur, par rapport à l'azote de l'extrait brut, que celui de *H. Dieu*³) (enrichissement de 200 fois contre 50). Il doit l'être encore bien davantage par rapport aux polysaccharides, car les précipitations alcooliques utilisées par cet auteur pour purifier l'enzyme ne permettent guère de le séparer des polysaccharides qui l'accompagnent. Or, *H. Dieu* a montré par la comparaison de ses «time values» à ceux déjà mentionnés qu'il avait obtenu le produit le plus enrichi.

Partie expérimentale.

Dosage d'activité.

1. Solution de saccharose à 5% tamponnée à pH 4,77 par ac. acétique-acétate de Na 1:1, m./50. Elle est conservée à froid en présence de quelques gouttes de toluène.

2. Solution contenant 10 g d'ac. dinitro-3,5-salicylique, 200 cm³ de NaOH 2-n. et 300 g de sel de *Seignette* portée à 1000 cm³. La solution est stable.

Opérations: Dans une éprouvette placée dans un thermostat à 20,0°, on met 1,0 cm³ de la solution d'enzyme. Lorsqu'elle a pris la température du bain (2 min.), on ajoute 1,0 cm³ de 1 porté préalablement à 20°. On interrompt la réaction après 3 min. par addition de 2 cm³ de 2. On plonge l'éprouvette pendant 5 min. dans de l'eau bouillante, refroidit et dilue par 20 cm³ d'eau. On lit ensuite au *Klett*, filtre vert N° 54, contre un blanc sans enzyme. L'extinction obtenue est exprimée en mg de glucose d'après une courbe étalon (le fructose donne la même valeur réductrice que le glucose). Celle-ci est une droite pour des quantités de glucose comprises entre 0 et 2 mg. La précision de la méthode est de $\pm 1\%$.

Dosage des polysaccharides.

Dosage colorimétrique direct: selon une modification apportée aux méthodes de *Morris*⁴) et de *Seifter*⁵).

¹) *M. Adams & C. S. Hudson*, Am. Soc. **65**, 1359 (1943).

²) *The Amer. Coll. Co.*, Chicago, Ill.

³) *H. A. Dieu*, Bl. Soc. Chim. Belg. **55**, 306 (1946).

⁴) *D. L. Morris*, Sc. **107**, 254 (1948).

⁵) *S. Seifter, S. Dayton, B. Novic & Ed. Muntwyler*, Arch. Biochem. **25**, 191 (1950).

1. Solution à 0,2% d'anthrone¹⁾ dans de l'ac. sulfurique à 95%. La solution doit être préparée à froid et peut alors être conservée environ 3 semaines, gardée à 0° dans un flacon brun.

Opérations: 5 cm³ contenant de 10 à 450 γ de sucre ou polysaccharide sont additionnés de 10 cm³ de 1. On plonge l'éprouvette dans de l'eau bouillante et agite la solution avec une baguette de verre à extrémité aplatie. Après 10 min., on plonge l'éprouvette dans un bain d'eau courante. On détermine ensuite l'extinction au *Klett*, filtre rouge N° 66 contre un blanc sans hydrate de carbone traité dans les mêmes conditions. L'extinction obtenue est exprimée en glucose d'après une courbe étalon. Les halogénures et les polyols gênent la réaction lorsqu'ils sont en excès.

Cette méthode rapide n'a été employée qu'à titre de dosage d'orientation. Elle n'est pas suffisamment sûre pour qu'on puisse se passer de la méthode classique.

Dosage après hydrolyse: une solution contenant 2 à 5 mg de polysaccharide est hydrolysée pendant 6 h. à reflux dans HCl 3-n., sous courant d'H₂. La solution est ensuite concentrée à sec, au vide, le résidu repris par 1 cm³ d'eau et cette solution est à nouveau évaporée. Le nouveau résidu est dissous dans 1 cm³ d'eau, neutralisé (rouge neutre) et porté à un volume connu (2 à 5 cm³). 2 cm³ de cette solution sont alors additionnés de 2 cm³ du réactif à l'ac. dinitro-3,5-salicylique (voir plus haut) puis comme indiqué pour le dosage d'activité, portés 5 min. dans l'eau bouillante, refroidis, dilués et lus au *Klett*. L'extinction obtenue est rapportée à une courbe étalon établie avec du glucose.

Purification de l'invertase: Routin-method.

Réactifs: 1. L'hydroxyde d'Al doit être fraîchement préparé et lavé 2 fois par suspension dans de l'eau distillée et centrifugation. Cette dernière ne doit pas dépasser 8000 t/min., car les culots trop tassés sont difficiles à remettre en suspension et le produit finalement obtenu possède un pouvoir adsorbant diminué (l'emploi d'une supercentrifugeuse continue, *Sharples* par exemple, est à déconseiller). Les culots sont remis en suspension au moyen du Vibro-Mischer²⁾; la suspension (env. 15—30 mg Al(OH)₃ par cm³) peut être gardée 1 mois environ.

2. *Solution picrique:* 3 g d'ac. picrique crist., 13 cm³ NaOH n., 2 cm³ de tampon acétate m. de pH 4,7, sont portés à 100 cm³ (à chaud). Cette solution cristallise lentement à froid. Au moment de l'emploi, on la rend homogène en la chauffant au bain-marie et la plonge dans de la glace de façon à la porter à 0°. Elle doit être limpide.

3. *Acétone:* redistillée sur KMnO₄ + Na₂CO₃.

4. *Eau distillée:* sur Ba(OH)₂ dans un appareil en étain.

Les précipitations acétонiques se font toujours à 0°, sous bonne agitation, en ajoutant le solvant préalablement refroidi à -20° sous forme d'un fin filet. Sauf mention spéciale, toutes les centrifugations se font à froid à 3000 t/min.

Extraction de la levure: 5 pains de levure de boulangerie³⁾ fraîche (2 kg 500) sont défaits, mis dans un poudrier de 5 l et additionnés de 200 g d'acétate de Na. Lorsque la masse est liquéfiée (15 à 20 min.), on ajoute 375 cm³ de toluène et émulsionne le tout 10 min. au Vibro-Mischer. Le poudrier est bouché et mis au thermostat à 37°. Après 60 h., on abaisse le pH de la suspension (tamponnée fortement aux env. de 4,8) à 4,5 par CH₃COOH 4-n. (env. 400 cm³) et centrifuge 1 h. ½. Il se forme 3 couches: celle du milieu constituée par une liqueur brune contient l'invertase dissoute. On la siphonne au vide, reprend les culots par de l'eau, homogénéise au Vibro-Mischer et recentrifuge. Les nouveaux culots sont rejettés et l'on réunit les liqueurs. On obtient env. 3300 à 3500 cm³ d'une solution jaune-brun trouble. 1 300 000 à 1 700 000 A total, 15 à 20 A/mg N et 5 à 10 A/mg S. La liqueur contient moins de 5% de sucres réducteurs.

Précipitation picrique: la solution précédente est portée à 0° et additionnée d'un coup de 0,35 vol. de la solution picrique. On abandonne la suspension pendant au minimum

¹⁾ R. Dreywood, Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) **18**, 499 (1946).

²⁾ A. G. für Chemie-Apparatebau, Zürich.

³⁾ Fabrique de levure S. A., Olten.

3 h. à froid, puis centrifuge 30 min. (évent. à la supercentrifugeuse *Sharples*). Les culots sont rejetés et la solution précipitée par 3 vol. d'acétone. On agite encore 30 min., décante la majeure partie de la solution et centrifuge le reste 7 min. La majeure partie de la substance active reste collée aux parois du bêcher et à l'agitateur, on la lave par 2 fois en la trituant avec de l'acétone à -20° , puis la dissout. Cette solution est dialysée pendant 48 à 72 h. à froid en changeant plusieurs fois l'eau extérieure (env. 12 l). Lorsque la liqueur externe ne se colore plus en jaune, on interrompt la dialyse et porte la solution interne à 5 l env. Si elle se trouble, on la passe rapidement à la *Sharples*.

Adsorption sur $Al(OH)_3$: la liqueur dialysée limpide est ajustée à pH 6,0, puis diluée par de l'eau jusqu'à avoir une activité de 60 à 80 A/cm³. On la traite alors à 0° , par petites portions, par la quantité minimum (déterminée préalablement sur une prise) de $Al(OH)_3$ de pH 6,0 nécessaire pour adsorber en 3 min. la totalité de l'enzyme en jeu (entre 12 et 36 A par mg d' $Al(OH)_3$).

Bien mélanger, répartir immédiatement la solution dans les tubes à centrifuger et mettre en marche la centrifugeuse exactement 3 min. après les mélanges (ne pas dépasser 10000 t/min.). La liqueur est rejetée et les culots sont suspendus au moyen du Vibro-Mischer dans le minimum d'eau.

Elution lactique: un traitement prolongé de la suspension en milieu acide entraînant la dissolution d'une trop grande quantité d'hydroxyde (en diminuant l'enrichissement par rapport aux hydrates de carbone), il est nécessaire de déterminer sur 2 ou 3 prises de 1 cm³ le temps minimum indispensable pour éluer l'enzyme.

1 cm³ de la suspension d'hydroxyde portée à 15° est additionné d'un tampon ac. lactique-lactate de NH_4 4-n. de pH 2,9 à raison de 5 cm³ par g d'hydroxyde. Après 10, 15 et 20 min., on centrifuge rapidement à 12000 t/min. puis détermine sur la liqueur décantée le pourcentage d'enzyme remis en solution (en général 100% après 15 min.). On traite alors la totalité de la suspension dans les mêmes conditions (centrifugation évent. à la *Sharples*). La solution est portée à pH 4,8 et précipitée par 3,5 vol. d'acétone. On centrifuge 6 min., puis les culots sont suspendus dans 300 cm³ d'eau. On élimine par centrifugation rapide un léger trouble formé par de l'hydroxyde.

Les secondes adsorptions et élutions s'effectuent dans les mêmes conditions sur cette solution limpide, diluée.

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

L'un de nous (*L. K.*) remercie vivement le Comité du «Concours interuniversitaire du Gouvernement Belge pour des Bourses de voyage» de l'appui généreux qu'il lui a donné.

RÉSUMÉ.

Une purification de l'invertase de levure de boulangerie est décrite.

Après plasmolyse et autolyse, l'extrait obtenu est traité par de l'acide picrique, puis l'enzyme est purifié par 2 adsorptions sur de l'hydroxyde d'aluminium, suivies d'élutions en milieu acide. La solution purifiée est stable.

Le produit purifié contient encore 70% de polysaccharides qu'on ne peut éliminer en répétant les mêmes adsorptions.

L'enrichissement de 200 fois par rapport à l'azote protéique et de 25 fois par rapport aux hydrates de carbone de l'extrait brut semble indiquer que le produit obtenu est un des plus purs qui ait été décrit jusqu'à présent.

Laboratoires de Chimie Organique
et Inorganique de l'Université, Genève.