

Ein in gleicher Weise aus der zweiten Fraktion bereitetes Präparat von Xa (98 mg) schmolz nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Hexan bei 140—141° und erwies sich mit der aus der 1. Fraktion gewonnenen Säure Xa in jeder Beziehung als identisch.

3,770 mg Subst. gaben 8,281 mg CO₂ und 2,696 mg H₂O
 $C_{10}H_{16}O_4$ Ber. C 59,98 H 8,05% Gef. C 59,94 H 8,00%

Die durch Verseifung der dritten Fraktion gewonnene Säure (99 mg) konnte nicht in kristallisierter Form gewonnen werden.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Durch einen stufenweisen Abbau von Ergosterin gelang es, die trans(+)1-Methyl-1-carboxy-cyclohexyl-(2)-essigsäure (Xa) zu bereiten. Über diese Verbindung sollen die Konfigurationen der Verknüpfungsstellen der ersten beiden Ringe der klassischen Steroide (IV) einerseits und des Lanostadienols (II) sowie der Di- und Triterpenverbindungen (Abietinsäure (II) und β -Amyrin (III)) anderseits auf rein experimenteller Basis miteinander in Beziehung gebracht werden.

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

237. Purification, cristallisation et propriétés de la β -amylase de blé.

Sur les enzymes amylolytiques 22¹⁾)

par Kurt H. Meyer †, P.-F. Spahr et Ed. H. Fischer.

(27 VIII 53)

I. Purification et cristallisation.

A la suite de nombreux travaux²⁾, on sait que la β -amylase dégrade les chaînes terminales des polyholosides du type de l'amidon et du glycogène à partir des extrémités non réductrices, en scindant deux par deux les restes de glucose sous forme de β -maltose. Son action s'arrête aux points d'embranchements formés par des liaisons α -1,6-glucosidiques, laissant une dextrine résiduelle appelée communément β -dextrine³⁾. Aussi la quantité de maltose libérée par l'enzyme permet-

¹⁾ Précédente communication, *Helv.* **35**, 257 (1952).

²⁾ K. Myrbäck, *Adv. in Carbohydrate Chemistry* **3**, 251 (1948); J. B. Sumner & K. Myrbäck, *The Enzymes*, Academic Press New York, Vol. I, Part. I, 653 (1951); K. H. Meyer, *Angew. Ch.* **63**, 153 (1951); S. Peat, *Adv. in Enzymology* **11**, 339 (1951); P. Bernfeld, *Adv. in Enzymology* **12**, 389 (1951).

³⁾ K. Myrbäck, *Adv. in Carbohydrate Chemistry* **3**, 265 (1948).

elle, lorsque l'on connaît le nombre des chaînes terminales, de calculer leur longueur moyenne.

Malheureusement, l'emploi de β -amylase est sérieusement limité par le fait que des traces d' α -amylase, scindant les chaînes internes entre les ramifications, permettent à la β -amylase de poursuivre son action jusqu'à une dégradation quasi-totale du polyholoside. Dès lors, l'obtention d'une β -amylase totalement dépourvue d' α -amylase ainsi que de tout autre enzyme pouvant agir sur la réaction amylolytique devenait particulièrement importante.

Parmi les nombreuses β -amylases, deux ont été déjà obtenues à l'état cristallisé: la β -amylase de patate douce (*Ipomoea batatas*) par *Balls et coll.*¹⁾ et celle de malt par *Meyer et coll.*²⁾.

Cependant ces deux préparations présentent plusieurs inconvénients, lorsque l'on veut obtenir de la β -amylase d'une façon courante et en quantités suffisantes. En effet, la β -amylase de patate douce est retirée d'une variété difficilement accessible («Porto Rican red»). Quant à la β -amylase de malt (orge germé), on la prépare à partir d'un extrait concentré commercial, dont les caractéristiques varient passablement d'une livraison à l'autre. Le traitement industriel que ce produit a subi élimine certainement des substances protectrices³⁾, ce qui rend la β -amylase contenue dans cet extrait plus sensible aux variations de pH. L'élimination de l' α -amylase se faisant par un traitement acide, on ne peut dès lors le prolonger au point d'être certain d'avoir détruit toute trace d' α -amylase. De plus, comme l' α -amylase apparaît au cours de la germination, l'utilisation d'une céréale non germée est beaucoup plus rationnelle. C'est pourquoi nous avons étudié la préparation de la β -amylase à partir du blé, produit de qualité constante et d'accès facile.

Le blé non germé est presque exempt d' α -amylase⁴⁾ et celle-ci apparaît au cours de la germination⁵⁾. La teneur en β -amylase du grain non germé dépend de la variété et de la région dans laquelle le blé est cultivé⁶⁾.

¹⁾ *A. K. Balls, R. R. Thompson & M. K. Walden, J. Biol. Chem. 163, 571 (1946); 173, 9 (1948).*

²⁾ *E. H. Fischer, K. H. Meyer, G. Noëting & A. Piguet, Arch. Biochem. 27, 235 (1950); K. H. Meyer, *Ed. H. Fischer & A. Piguet, Helv. 34, 316 (1951).**

³⁾ *E. Bamann & K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, vol. II, p. 1848, Georg Thieme, Leipzig 1941.*

⁴⁾ *G. A. van Klinkenberg, Z. physiol. Ch. 209, 253 (1932); P. S. Ugrümow, Bioch. Z. 282, 74 (1935); R. H. Hopkins, R. H. Murray & A. R. Lockwood, Biochem. J. 40, 507 (1946); T. G. Halsall, E. L. Hirst, L. Hough & J. K. N. Jones, Soc. 1949, 3200.*

⁵⁾ *J. S. Andrews & C. H. Bailey, Cereal Chem. 11, 551 (1934); F. C. Hildebrand & G. M. Burkert, Cereal Chem. 19, 27 (1942); E. Kneen, Cereal Chem. 21, 304 (1944).*

⁶⁾ *I. Sosedov & Z. B. Drozdova, Biokhimija 1, 390 (1936); S. S. Elizarova, C. r. Acad. Sci. URSS. 26, 698 (1940), réf. C. 1940, 1594; E. Kneen, B. S. Miller & R. M. Sandstedt, Cereal Chem. 19, 11 (1942); E. Kneen & L. Hads, Cereal Chem. 22, 407 (1945).*

Bien que le blé soit aussi riche en β -amylase¹⁾ que les autres céréales, sinon plus²⁾, peu d'auteurs l'ont utilisé comme produit de départ. On lui a préféré en général l'orge et le malt ou encore le soja. Les méthodes décrites utilisent une extraction aqueuse ou alcoolique suivie d'une simple précipitation ou d'un fractionnement à l'alcool³⁾. Certains auteurs⁴⁾ effectuent l'extraction par une solution diluée de sulfite de sodium, ce qui augmenterait le rendement en amylase. D'autres méthodes combinent l'inactivation de l' α -amylase par acidification, avec une précipitation ou un fractionnement alcoolique ou acétonique. Le fractionnement au sulfate d'ammonium a également été utilisé pour la purification de la β -amylase⁵⁾. Ces différentes méthodes conduisent à des produits encore assez impurs et inhomogènes.

Nous avons pu obtenir la β -amylase de blé pure, cristallisée et exempte d' α -amylase, de maltase et de β -glucosidases.

Produit de départ et extraction.

On part de farine fleur fraîchement moulue que l'on extrait par le minimum d'eau possible. La β -amylase étant très soluble dans l'eau, on augmente ainsi le degré de pureté de l'extrait. En disposant d'une centrifugeuse à 20 000 t/min.⁶⁾, on peut extraire jusqu'à 4 kg de farine par 6 litres d'eau.

Elimination de l' α -amylase.

*Ohlsson*⁷⁾ ayant constaté que l' α -amylase est détruite en milieu acide, nous abaissons le pH de l'extrait de farine de blé à 3,7 par l'acide acétique, valeur que l'on ne peut dépasser vu l'effet tampon du milieu. Dans ces conditions et à 0°, l' α -amylase est désactivée en moins de 48 heures. Ce traitement doit s'effectuer sur l'extrait brut, avant toute autre opération de purification qui enlèverait des stabilisateurs⁸⁾ de la β -amylase vis-à-vis des pH acides nécessaires.

La quantité d' α -amylase contenue dans le blé variant avec la saison, on constate une perte d'activité totale de l'ordre de 10 à 15 %. La fig. 1 montre la variation de l'activité amylatique en fonction du temps durant le traitement acide, dans le cas d'une extraction faite en février.

¹⁾ *M. J. Blish, R. M. Sandstedt & E. Kneen, Cereal Chem.* **15**, 629 (1938); *C. H. Bailey, The Constituents of Wheat and Wheat Products*, Reinhold, New-York 1944; *J. E. Anderson, Enzymes and their Role in Wheat Technology*, Interscience, New-York 1946; *F. W. Geddes, Adv. in Enzymology* **6**, 415 (1946).

²⁾ *T. Stenstam, C. O. Björling & E. Ohlsson, Z. physiol. Ch.* **226**, 265 (1934); *G. A. Ballou & J. M. Luck, J. Biol. Chem.* **139**, 233 (1941); *J. Davidson, J. Agr. Research* **70**, 175 (1945).

³⁾ *G. A. van Klinkenberg, Z. physiol. Ch.* **209**, 253 (1932); *G. A. Ballou & J. M. Luck, J. Biol. Chem.* **139**, 233 (1941); *L. H. Ford & S. Peat, Soc.* **1941**, 856; *T. G. Halsall, E. L. Hirst, L. Hough & J. K. N. Jones, Soc.* **1949**, 3200.

⁴⁾ *A. K. Balls & I. W. Trucker, Fruit Products J.* **23**, 15 (1943).

⁵⁾ *M. J. Blish, R. M. Sandstedt & D. K. Meecham, Cereal Chem.* **14**, 605 (1937).

⁶⁾ «Spinco Model L préparative Ultracentrifuge», Belmont, Calif., U.S.A.

⁷⁾ *E. Ohlsson, C. r. trav. Lab. Carlsberg. Sér. Chim.* **16**, 7 (1926); *E. Ohlsson, Z. physiol. Ch.* **189**, 17 (1930).

⁸⁾ *E. Bamann & K. Myrbäck, l. c.*

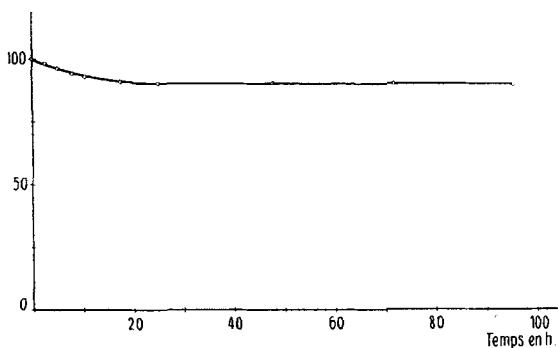


Fig. 1.

Inactivation de l' α -amylase à pH 3,7. Diminution du pouvoir amyloytique en fonction du temps.

Purification de l'enzyme.

Une grande partie des impuretés est éliminée par un premier fractionnement au sulfate d'ammonium (SA) à pH 5,5, dans de larges limites de concentration (de 0,21 à 0,59 saturation de SA) suivi d'un deuxième fractionnement à pH 5,3 et dans des limites plus étroites (de 0,27 à 0,40 saturation). Un troisième fractionnement au SA n'augmente plus le degré de pureté.

Par contre, on peut purifier à nouveau l'enzyme par deux pré-cipitations fractionnées successives à pH 7,1 puis à pH 6,1, effectuées au SA sur des solutions portées préalablement à 0,3 saturation en NaCl («mixed salt precipitation»). En élevant ainsi la force ionique de la solution, on constate que les premières fractions entraînent la majeure partie des impuretés.

En soumettant l'enzyme brut obtenu ainsi à deux fractionnements à l'acétone, le premier à pH 6,0 et le second à pH 7,7 en présence d'acétate d'ammonium, on obtient finalement un produit blanc et pulvérulent, encore amorphe mais déjà homogène à l'électrophorèse (fig. 2), exempt de sucres et de polyholosides et d'un degré de pureté de 1300 mg maltose/mg d'azote.

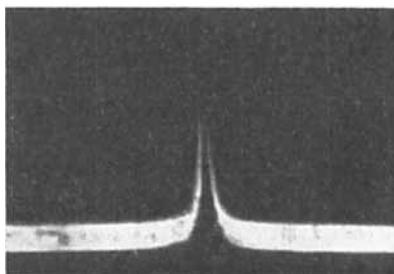


Fig. 2.

Diagramme électrophorétique de la β -amylase de blé purifiée (microélectrophorèse *Boskamp*, Hersel/Bonn). Solution à 1,5% de protéines, pH: 8,6; μ = 0,1. Durée: 30 min. sous 55 V et 2 mA.

Le tableau I résume les résultats des divers stades de cette purification.

Tableau I.

Stade	Opération	Rendement par rapport au produit de départ	Degré de pureté	Enrichissement par rapport au stade I
I	Extraction aqueuse .	—	90	—
II	Traitemennt acide . .	90%	80	—
III	SA 1	61%	140	1,5
IV	SA 2	48%	200	2,2
V	SA 3	32%	320	3,6
VI	SA + NaCl 1	24%	560	6,2
VII	SA + NaCl 2	15%	750	8,3
VIII	Acétone 1	10%	1000	11,1
IX	Acétone 2	8%	1300	14,5

Cristallisation.

La très grande solubilité de la β -amylase de blé dans l'eau et les solvants dilués rend sa cristallisation très difficile. En concentrant ses solutions aqueuses on n'obtient que des sirops de plus en plus visqueux. L'addition d'acétone provoque un précipité floconneux et amorphe. Par contre, en diminuant la solubilité de la β -amylase de blé par le SA et sous certaines conditions (présence de NaCl, basse température, solutions concentrées et agitation sous vide), nous avons pu obtenir des cristaux (fig. 3).



Fig. 3.
 β -Amylase de blé cristallisée (850 \times).

II. Propriétés.

Proportionnalité entre concentration de l'enzyme et maltose libéré: entre 0 et 1,5 mg, la quantité de maltose libérée à partir de 10 mg d'amidon est proportionnelle à la concentration de l'enzyme mise en jeu (fig. 4). On peut donc doser l'activité de l'enzyme par la quantité de maltose formée, à condition que la dégradation du substrat (amidon Zulkowski ou Noredux) ne dépasse pas 15 %.

Degré de pureté: après trois recristallisations, le degré de pureté est constant et atteint 1450 mg maltose/mg d'azote *Kjeldahl*.

Solubilité: Très soluble à pH 7, l'enzyme ne peut être cristallisé à partir de sa solution aqueuse que par addition de sels (SA et NaCl).

Extinction au photocalorimètre
Klett. Summerson (filtre 54)

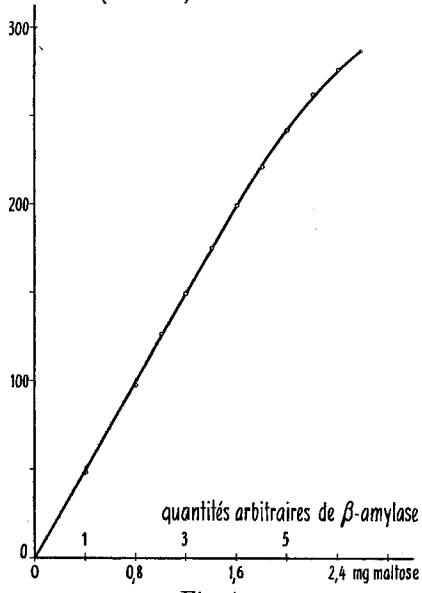


Fig. 4.

Proportionnalité entre concentration de l'enzyme et maltose libéré.

Activité en fonction du pH: la β -amylase de blé est active entre les pH 2,2 et 9,3 avec une zone optima allant de pH 4,8 à 6,5 et un maximum à pH 5,3. Ces résultats sont comparés sur la fig. 5 à ceux obtenus avec la β -amylase de malt¹).

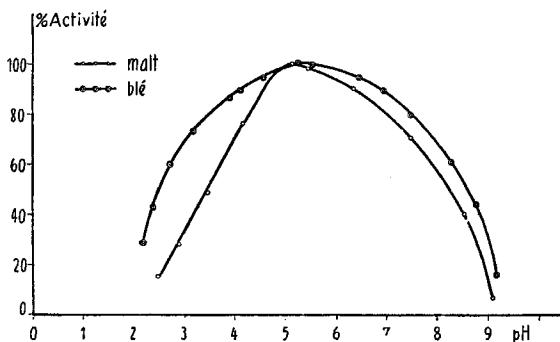


Fig. 5.

Activité en fonction du pH de la β -amylase de blé comparée à celle de malt.

¹) A. Piguet & Ed. H. Fischer, Helv. 35, 257 (1952).

Stabilité: les solutions aqueuses de l'enzyme cristallisé sont particulièrement stables, à condition de ne pas être trop diluées. En suspension dans une solution de SA à 0,6 de saturation, la β -amylase de blé se conserve parfaitement à froid durant des mois. A 20°, aucune perte d'activité n'a été observée en solution aqueuse après 20 h. entre les pH 4,5 et 9,2. La stabilité en fonction du pH de la β -amylase de blé et de celle de malt sont comparées dans la fig. 6.

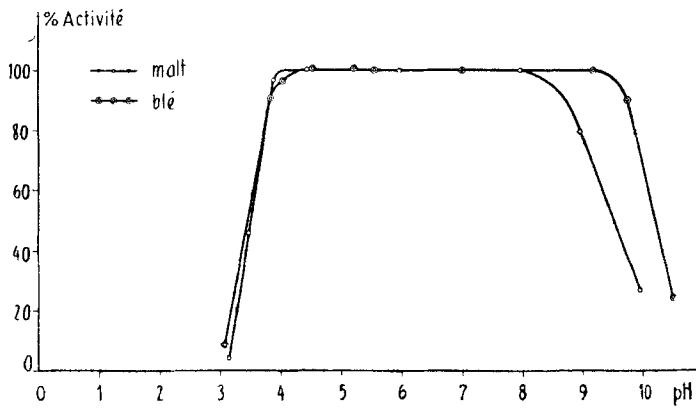


Fig. 6.

Stabilité en fonction du pH de la β -amylase de blé comparée à celle de malt, après 20 h. à 20°.

Activité en fonction de la température: l'activité de la β -amylase de blé augmente avec la température pour atteindre un maximum vers 50° et pour diminuer ensuite rapidement par suite de désactivation (fig. 7). Comme pour l' α -amylase de malt¹⁾, la vitesse de réaction v est exprimée ici en mg maltose libérés par minute par une quantité donnée d'enzyme, dans une solution d'amidon Zulkowski ou de Noredoux à 0,5 % et à pH 4,8. En calculant les coefficients de température, on trouve les valeurs suivantes :

$$\begin{array}{ll} 2,26 \text{ entre } 0^\circ \text{ et } 10^\circ & 1,72 \text{ entre } 20^\circ \text{ et } 30^\circ \\ 2,15 \text{ entre } 10^\circ \text{ et } 20^\circ & 1,68 \text{ entre } 30^\circ \text{ et } 40^\circ \\ 1,51 \text{ entre } 40^\circ \text{ et } 50^\circ & \end{array}$$

En calculant l'énergie d'activation selon l'équation :

$$\ln(v_2/v_1) = A/R(1/T_1 - 1/T_2),$$

on constate que, comme la β -amylase de malt, la β -amylase de blé possède une énergie d'activation nettement variable (fig. 8), soit 13 000 cal/mole entre 0° et 20° et 9300 cal/mole entre 20° et 50°.

Activation et inhibition: l'ion Ca^{++} , indispensable à l' α -amylase de malt, et l'ion Cl' , nécessaire aux α -amylases animales, n'ont pas d'influence sur l'activité de la β -amylase de blé. L'activité est conservée après dialyse prolongée à froid contre de l'eau distillée. L'addition de «complexon II» (acide éthylènediamine-tétracarboxylique) n'influe pas

¹⁾ Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, Helv. 34, 325 (1951).

sur l'activité de la β -amylase, alors que ce corps désactive complètement l' α -amylase de malt en fixant les ions Ca^{++} en solution¹). L'enzyme est par contre très sensible à l'action des métaux lourds, car il contient des groupes $-\text{SH}$: le cuivre(II) et le mercure(II), à des concentrations très faibles (0,0001-n.), le désactivent instantanément et irréversiblement. Ces résultats concordent avec ceux trouvés pour la β -amylase de malt²).

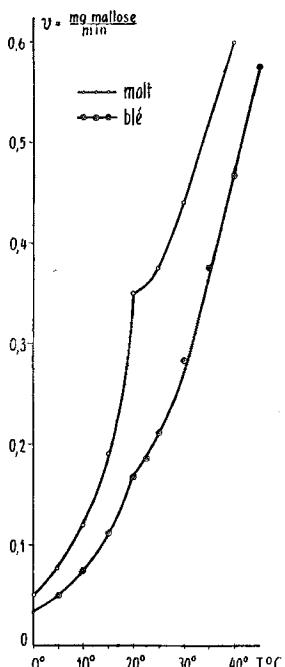


Fig. 7.

Vitesse de réaction, en fonction de la température, de la β -amylase de blé comparée à celle de malt.

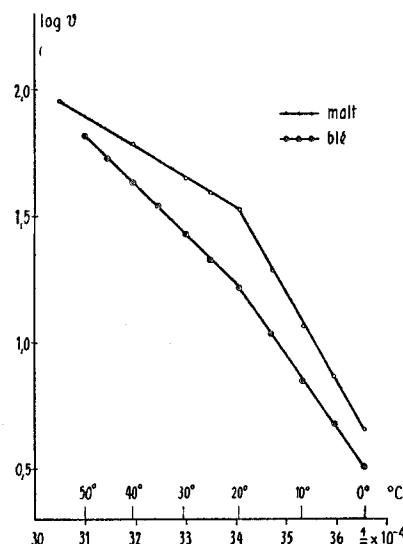


Fig. 8.

Logarithme de la vitesse de réaction de la β -amylase de blé et de celle de malt, en fonction de l'inverse de la température absolue.

Spectre d'absorption: comme pour les autres amylases, le spectre d'absorption de la β -amylase de blé dans l'ultra-violet présente un maximum à $280 \text{ m}\mu$ et un léger point d'infexion à $290 \text{ m}\mu$ à pH 6,0. En présence de NaOH 0,1-n., on n'observe qu'un léger déplacement du maximum vers $288 \text{ m}\mu$, sans que l'allure de la courbe soit spécialement modifiée (fig. 9).

Comparaison des propriétés des β -amylases cristallisées: le tableau II rapporte les propriétés de la β -amylase de blé, de la β -amylase de patate douce et de la β -amylase de malt^{2,3}).

¹⁾ Ed. H. Fischer & C. H. Haselbach, Helv. **34**, 325 (1951).

²⁾ A. Piguet & Ed. H. Fischer, Helv. **35**, 257 (1952).

³⁾ A. K. Balls, R. R. Thompson & M. K. Walden, J. Biol. Chem. **163**, 571 (1946); **173**, 9 (1948); S. Englund & Th. P. Singer, J. Biol. Chem. **187**, 213 (1950); K. H. Meyer, Angew. Ch. **63**, 153 (1951).

Tableau II.

	Propriétés des β -amylases cristallisées de		
	blé	malt	patate douce
Activité par mg d'azote	1450	1660	2500
Activité par mg d'enzyme	198	235	378
% d'azote.	14,3	14,1	15,1
Groupes —SH	+	+	+
pH optimum d'action	5,3	5,2	4—5
pH optimum de stabilité	4,5—9,2	4,5—8,0	—
Energies d'activation (cal/mole)			
Entre 0° et 20°	13000	16200	—
Entre 20° et 40°	9300	5530	—
Point isoélectrique	6,0	6,0	4,77
Spectre d'absorption (m μ)			
Maximum	280	280	—
Point d'infexion	290	—	—
Désactivation par Cu ⁺⁺ et Hg ⁺⁺	+	+	+

Extinction Beckman

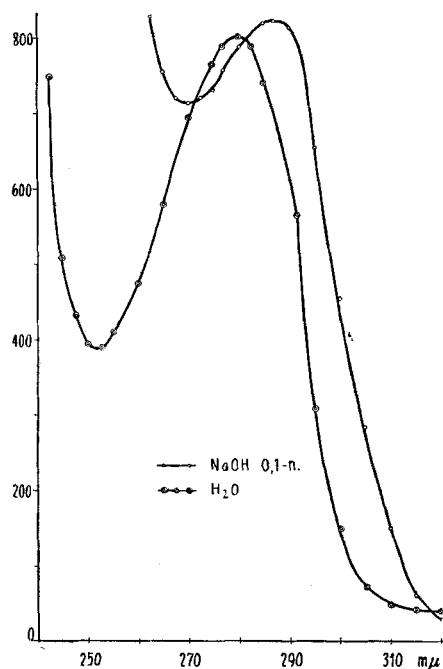


Fig. 9.

Spectre d'absorption de la β -amylase de blé. Spectrophotomètre *Beckman*, cuves de 1 cm, concentration en protéines: 0,07%.

Partie expérimentale.

Purification de la β -amylase de blé.

Dosage de la β -amylase: il s'effectue d'après la méthode colorimétrique à l'acide dinitro-3,5-salicylique¹⁾. L'unité de β -amylase (activité) est la quantité d'enzyme qui libère 1 mg maltose en 3 min. à 20° à partir d'une solution d'amidon Zulkowski (respectivement de Noredoux²⁾) à 1% et à pH 5,2. La quantité d'enzyme introduit doit être telle que la dégradation du substrat ne dépasse pas 15%.

Degré de pureté: il est exprimé par l'activité rapportée à une quantité d'enzyme équivalent à 1 mg d'azote protéique (Kjeldahl).

Eau: distillée sur BaO avec réfrigérant en étain.

Acétone: redistillée sur permanganate et carbonate de sodium. Elle contient 2% d'humidité.

Centrifugations: à 20000 t/min. sauf indications spéciales.

Température: toutes les opérations, sauf l'extraction, se font au-dessous de 5° et sous agitation; les fractionnements se font dans un bain de glace fondante, sous bonne agitation (continuée pendant au moins 10 min. après l'addition de l'agent précipitant).

Stade I: 4 kg de farine de blé (farine fleur) fraîchement moulue sont introduits par petites portions dans 6 l d'eau, à température ordinaire (agitateur en acier inox., le mélange devenant très épais). On interrompt l'agitation 8 h. après le début de l'opération et centrifuge la pâte le lendemain. On recueille 3780 cm³ d'un extrait visqueux et légèrement coloré en rouge. Activité: 160 mg maltose/cm³; azote: 1,8 mg/cm³.

Stade II: le pH de l'extrait est abaissé à 3,7 par 90 cm³ d'acide acétique 5-n. et la solution est abandonnée 6 jours à 0°. Activité: 140 mg maltose/cm³; azote: 1,7 mg/cm³.

Stade III: la solution précédente (3870 cm³) est ajustée à pH 5,3 par addition lente de 370 cm³ d'ammoniaque à 4% et précipitée en 5 min. par 8500 cm³ d'une solution de sulfate d'ammonium saturée à 0° (SAS) de pH 5,3 (\rightarrow 0,66 sat.)³⁾. On centrifuge à la supercentrifugeuse continue Sharples (50000 t/min.). Le culot est trituré avec 720 cm³ d'eau, abandonné au froid 4 à 5 h. puis centrifugé. On obtient 790 cm³ de liqueur. Activité: 470 mg maltose/cm³; azote: 3,4 mg/cm³.

Stade IV: le pH de la solution III est ajusté à 5,5 par de l'ammoniaque à 4% et le volume porté à 1600 cm³ par addition d'eau (teneur en protéines: 1,2% environ). On ajoute alors, en 20 min., 425 cm³ de SAS de pH 5,5 (\rightarrow 0,21 sat.), puis centrifuge. La solution surnageante (1980 cm³) est amenée à 0,59 sat. par 1830 cm³ de SAS de pH 5,5 puis centrifugée. Le culot est dissous dans de l'eau ad 200 cm³. Activité: 1450 mg maltose/cm³; azote: 7,2 mg/cm³.

Stade V: le pH de la solution précédente est ajusté à 5,3 par de l'ammoniaque à 4% et son volume porté à 475 cm³ par addition d'eau (teneur en protéines: 2,1% environ). On précipite en 20 min. par addition de 175 cm³ de SAS de pH 5,3 (\rightarrow 0,27 sat.), puis centrifuge. La liqueur surnageante (630 cm³) est amenée à 0,4 sat. par 136 cm³ de SAS de pH 5,3, introduits en 20 min. On centrifuge. Le culot est dissous ad 100 cm³. Activité: 1950 mg maltose/cm³; azote: 6,1 mg/cm³.

Stade VI: la solution V est ajustée à pH 7,1 par addition de 12 cm³ d'ammoniaque 0,2-n. puis diluée par de l'eau à 400 cm³ (teneur en protéines: 1% environ). On y dissout 40 g de NaCl (soit 100 mg NaCl/cm³ = 0,3 sat. en NaCl), ajoute en 20 min. 163 cm³ de SAS de pH 7,1 (\rightarrow 0,29 sat.), puis centrifuge. La liqueur surnageante (550 cm³), amenée à 0,48 sat. par addition de 200 cm³ de SAS de pH 7,1, est centrifugée. Le volume du culot, dissous dans l'eau distillée, est porté à 80 cm³. Activité: 1850 mg maltose/cm³; azote: 3,3 mg/cm³.

Stade VII: on porte le pH de la solution VI à 6,1 par de l'ammoniaque 0,2-n. et dilue à 160 cm³ (teneur en protéines: 1,1% environ). On y dissout 16 g de NaCl (100 mg/cm³),

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

²⁾ Siegfried AG., Zofingue (Suisse).

³⁾ Les chiffres entre parenthèses indiquent les teneurs finales en agents précipitants.

précipite en 10 min. par 65 cm^3 de SAS de pH 6,1 ($\rightarrow 0,29 \text{ sat.}$), puis centrifuge. La liqueur surnageante (220 cm^3) est amenée à 0,41 sat. par addition de 45 cm^3 de SAS de pH 6,1 en 10 min. On centrifuge et dissout le culot à 30 cm^3 dans de l'eau distillée. Activité: $3000 \text{ mg maltose/cm}^3$; azote: $4,0 \text{ mg/cm}^3$.

Stade VIII: On ajuste, si c'est nécessaire, le pH de la solution VII à 6,0, ajoute 1 cm^3 d'une solution 0,5-n. d'acétate d'ammonium de pH 6,0 et porte à 64 cm^3 par de l'eau distillée (teneur en protéines: 1,3% environ). On précipite par 64 cm^3 d'acétone ($\rightarrow 49\%$), agite 5 min. puis centrifuge 10 min. à 3000 t/min. et à 0° . La liqueur surnageante (125 cm^3) est portée à 63% d'acétone par 50 cm^3 d'acétone. On agite, centrifuge et dissout le culot dans 15 cm^3 d'eau. Activité: $4000 \text{ mg maltose/cm}^3$; azote: $4,0 \text{ mg/cm}^3$.

Stade IX: On ajuste le pH de la solution VIII à 7,7 par de l'ammoniaque 0,1-n., ajoute $0,5 \text{ cm}^3$ d'une solution 0,5-n. d'acétate d'ammonium de pH 7,7 et porte le volume à 21 cm^3 . On précipite alors par 23 cm^3 d'acétone ($\rightarrow 51\%$), agite pendant 5 min., puis centrifuge 10 min. à 3000 t/min. à 0° . La solution surnageante (40 cm^3) est alors portée à 65% par 17 cm^3 d'acétone. On agite, centrifuge et dissout le culot dans 10 cm^3 d'eau. Teneur en protéines: 2,5% environ. Activité: $4800 \text{ mg maltose/cm}^3$; azote: $3,7 \text{ mg/cm}^3$.

Cristallisation et recristallisations.

La solution IX est précipitée par 20 cm^3 de SAS de pH 5,8 ($\rightarrow 0,66 \text{ sat.}$), centrifugée à 40000 t/min.^1 ; le culot est repris par 3 cm^3 d'eau distillée et additionné de 200 mg de NaCl. A la solution limpide, on ajoute quelques cristaux de SA puriss. jusqu'au premier trouble que l'on dissipe par une goutte d'eau. Cette solution est concentrée sous un faible vide, sur silicagel et sous agitation modérée, à une température inférieure à 5° . Après 24 h. environ, on interrompt le vide et agite encore une semaine. On centrifuge la suspension formée de cristaux mélangés à du matériel amorphe. Pour les recristallisations, on redissout le culot dans quelques gouttes d'eau, ajoute du NaCl et du SA solide, etc., en procédant à nouveau comme ci-dessus.

Tests de pureté.

Electrophorèse: Après 30 min., sous 55 V et 2 mA , des solutions (1,5% en protéines) de β -amylase soit purifiée, soit cristallisée, ne montrent qu'un composant à la micro-electrophorèse (Boskamp) et ceci à différents pH: 4,8; 7,5; 8,6.

Contrôle de l'absence de sucres et de polyholosides: Aucun hydrate de carbone n'a pu être décelé dans le produit cristallisé, ni par la méthode colorimétrique à l'acide dinitro-3,5-salicylique²) avant ou après hydrolyse, ni par la méthode à l'anthrone³). En tenant compte de la limite de sensibilité de ces méthodes, nous pouvons affirmer que notre produit contient moins de 0,1% d'hydrate de carbone.

Contrôle de l'absence d'autres enzymes: α -amylase: une solution de notre produit purifié a été mis en présence d'une solution de β -dextrine résiduelle²). Après plusieurs jours à 20° et à pH 5,2, aucune augmentation du pouvoir réducteur de la dextrine n'a été constatée. La coloration à l'iode de l'incubat restant la même, l'enzyme est certainement exempt de toute trace d' α -amylase.

Maltase et β -glucosidases: substrat: 6 cm^3 de solution resp. de maltose, de salicine, de phloridzine et de cellobiose à 1%, + 1 cm^3 de tampon à l'acétate de pH 4,8; enzyme: solution de β -amylase cristallisée, d'une activité de $1500 \text{ mg maltose/cm}^3$. Les essais ont été effectués à la température ordinaire; 3 cm^3 de la solution d'enzyme ont été ajoutés à 7 cm^3 de la solution de chacun des substrats. Après 2, 6, 20, 48, 72, 96 et 120 h., on pré-lève une goutte de chaque mélange, la dépose sur une feuille de papier *Watmann* n° 1 et bloque la réaction enzymatique par chauffage aux rayons infra-rouges. Sur chacune des feuilles, on dépose préalablement une goutte de glucose comme témoin. Les spots sont alors chromatographiés dans un mélange n-butanol-pyridine-eau (3:1:1,5)⁴), séchés,

¹⁾ «Spinco Model L preparative Ultracentrifuge» Belmont, Calif., U.S.A.

²⁾ G. Noelting & P. Bernfeld, *Helv.* **31**, 236 (1948).

³⁾ Ed. H. Fischer & L. Kohtz, *Helv.* **34**, 1129 (1951).

⁴⁾ A. Jeanes, C. S. Wise & R. J. Dimler, *Anal. Chem.* **23**, 415 (1951).

puis révélés au phtalate d'aniline¹). Par dessiccation dans une étuve à 110°, les taches dues aux sucres réducteurs apparaîtraient rapidement. L'essai a été négatif. La méthode permettant de déceler une hydrolyse des substrats de l'ordre de 1%, ce résultat exclut la présence d'une maltase ou de β -glucosidases. Les mêmes substrats sont intégralement dégradés en moins d'une heure, sous les mêmes conditions, par l'extrait brut.

Propriétés.

Activité en fonction du pH: on dose le maltose libéré par l'action, pendant 3 min. à 20°, de 1 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 1 mg maltose/cm³ sur 1 cm³ de substrat (0,5 cm³ d'une solution d'amidon *Zulkowski* ou de Noredux à 2%)+0,5 cm³ des tampons suivants:

- 1^o pH 2,2 et 2,4: tartrate de sodium-acide tartrique 0,1-m.
- 2^o pH 2,7 et 3,9: lactate de sodium-acide lactique 0,1-m.
- 3^o pH 4,1 à 5,6: acétate de sodium-acide acétique 0,1-m.
- 4^o pH 6,5 à 8,3: phosphates de sodium et potassium 0,1-m.
- 5^o pH 9,2: tampon au véronal 0,1-m.
- 6^o pH 10,5: tampon au glycocolle 0,1-m.

Proportionnalité entre concentration de l'enzyme et maltose libéré: 1 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 250 mg maltose/cm³ est diluée à 10 cm³ par de l'eau bouillie. On effectue à partir de cette solution différentes dilutions dont on mesure l'activité.

Stabilité en fonction du pH: on introduit dans des éprouvettes des prises de 2 cm³ d'une solution de β -amylase d'une activité de 30 mg maltose/cm³ et 2 cm³ de chacun des tampons précédents; on ajoute chaque fois 2 gouttes de toluène et abandonne le tout à 20°. Aux temps voulus, on prélève 1 cm³, dilue à 11 cm³ en ajoutant 10 cm³ de tampon à l'acétate pH 5,2 (0,1-m.) et dose l'activité sur 1 cm³ de cette solution diluée.

Variation de l'activité en fonction de la température: on prépare séparément une solution d'amidon *Zulkowski* ou de Noredux à 1% tamponnée à pH 5,2 par un tampon à l'acétate, et une solution d'enzyme d'une activité de 0,6 mg maltose/cm³. Ces solutions sont portées préalablement à la température voulue (variant de 5° en 5°, entre 0° et 50°). Une fois cette température atteinte, on mélange des volumes égaux des deux solutions et détermine les temps nécessaires à la libération de 0,6 mg de maltose environ, qu'on dose à l'acide dinitro-3,5-salicylique.

Influence des ions Cl⁻ et Ca⁺⁺: 1 cm³ d'une solution d'enzyme dialysée, d'une activité de 50 mg maltose/cm³, dilué à 50 cm³ dans une solution de NaCl 0,1-m. n'a montré aucune augmentation d'activité. 1 cm³ de la même solution d'enzyme dilué dans 50 cm³ d'une solution d'acétate de calcium 0,01-m. donne au dosage une extinction correspondant à une activité de 1,0 mg maltose/cm³.

Action des métaux lourds: deux prises de 10 cm³ d'une solution d'enzyme d'une activité de 50 mg maltose/cm³ sont additionnés respectivement de 1 cm³ d'une solution de sulfate de cuivre 0,001-m. et de 1 cm³ d'une solution de chlorure mercurique 0,001-m. Dans les deux cas il y a désactivation totale et immédiate de la β -amylase qui n'est pas réactivée par un traitement à l'hydrogène sulfuré.

Nous remercions vivement le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* (Berne) et la *Rockefeller Foundation* (New York) de l'aide qu'ils nous ont accordée.

SUMMARY.

Purification and crystallization of β -amylase from wheat flour are described.

After destruction of α -amylase in acid medium, β -amylase has been purified by SAS, "mixed salt" (SAS + NaCl), and acetone fractionation. 250 mg of final product were obtained from 4 kg of flour

¹⁾ S. M. Partridge, Nature 164, 443 (1949).

after a 15-fold enrichment and with an 8% yield in relation to the original $\alpha + \beta$ -amylase activity.

The purified enzyme reveals only one component in electrophoresis. It is free from sugars and polysaccharides and has, as all the other amylases, a maximum of absorption at 280 m μ , with an inflection point at 290 m μ .

The enzyme is without action upon maltose, salicine, phloridzin and cellobiose (lack of maltase and β -glucosidases) and upon a β -dextrin (complete absence of α -amylase).

β -amylase is extremely soluble in water. Its suspension in aqueous ammonium sulphate can be kept at least 6 months in the cold without loss of activity.

The crystallized product has a specific activity of 1,450 mg maltose/mg nitrogen at the optimal pH of 5.2; neither Ca⁺⁺ nor Cl⁻ are necessary for its activity. Wheat β -amylase is rapidly and irreversibly destroyed by heavy metal ions (Cu⁺⁺ and Hg⁺⁺).

The activation energy of the enzyme presents a break at 20°. Values of 13,000 cal/mole between 0 and 20° and 9,300 cal/mole between 20 and 50° have been found.

The properties of crystalline wheat β -amylase are compared with those of malt β -amylase.

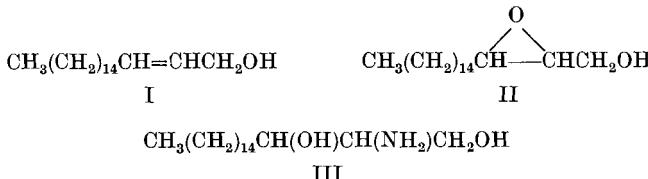
Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève.

238. Die Synthese von *erythro*-Dihydro-sphingosin aus *trans*-2-Octadecen-1-säure

von E. F. Jenny¹⁾ und C. A. Grob.

(13. X. 53.)

In einer vorangegangenen Mitteilung²⁾ wurde die Herstellung der *cis*- und *trans*-Formen des 2-Octadecen-1-ols (I) beschrieben. Beide Isomeren liefern die entsprechenden 2,3-Epoxy-octadecan-1-ole (II), von welchen das *cis*-Isomere



¹⁾ Auszug aus der Dissertation E. F. Jenny, Basel 1953.

²⁾ E. F. Jenny & C. A. Grob, Helv. **36**, 1454 (1953).