

Ameisensäure und Formaldehyd konnten unter den Oxydationsprodukten nicht nachgewiesen werden<sup>1</sup>).

Oxydation von D-Fructose-phenylosotriazol (XVIII) zur Phenyltriazol-carbonsäure XX<sup>2</sup>). 1 g Fructose-phenylosotriazol wurde mit 50 cm<sup>3</sup> 20-proz. Salpetersäure 5 Std. am Rückfluss gekocht. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei der analogen Oxydation von 3,6-Anhydro-D-fructose-phenylosotriazol. Die Phenyltriazol-carbonsäure XX kristallisierte beim Eindampfen der Ätherauszüge.

Das Analysenpräparat wurde zweimal bei 90° im Hochvakuum sublimiert. Das Sublimat schmolz bei 190°.

3,738 mg Subst. gaben 7,815 mg CO<sub>2</sub> und 1,250 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 57,13 H 3,73% Gef. C 57,06 H 3,74%

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

### Zusammenfassung.

Die beiden von *Diels* und von *Percival* aufgestellten Konstitutionsformeln für das *Diels*'sche Anhydro-glucose-phenylosazon wurden widerlegt; diese Verbindung wurde als 3,6-Anhydro-D-psicose-phenylosazon erkannt und deren Konstitution bewiesen.

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

## 31. Dégradation $\beta$ -amylatique et arsénolytique de l'amylopectine. Sur les enzymes amylolytiques 20<sup>3</sup>)

par Kurt H. Meyer, R. M. Weil et Ed. H. Fischer.

(14 XII 51)

Parmi les nombreux problèmes non résolus de la chimie de l'amidon, ceux qui ont trait à la synthèse et à la scission des liaisons  $\alpha$ -1,6 formant les embranchements restent particulièrement confus.

On sait que la phosphorylase scinde une à une les liaisons  $\alpha$ -1,4 glucosidiques de l'amidon, à partir des extrémités non réductrices des branches de ce polysaccharide<sup>4</sup>); son action s'arrête aux liaisons  $\alpha$ -1,6 glucosidiques<sup>5</sup>). Toutefois, la limite à laquelle la réaction enzymatique prend fin est encore très controversée.

<sup>1</sup>) Vgl. Seite 245.

<sup>2</sup>) Vgl. H. El Khadem, Diss. ETH. 1950.

<sup>3</sup>) Précédente Communication: Helv. **34**, 1994 (1951).

<sup>4</sup>) J. K. Parnas & T. Baranowski, C. r. Soc. Biol. **121**, 282 (1936); *Ergebn. Enzymforschung* **6**, 57 (1937); A. Schöffner & Specht, *Naturwiss.* **26**, 494 (1938); G. T. Cori, S. P. Collowick & C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* **123**, 375 (1938); C. S. Hanes, *Proc. Roy. Soc. (London) B* **129**, 174 (1940).

<sup>5</sup>) K. H. Meyer & P. Bernfeld, *Helv.* **25**, 404 (1942); W. H. Haworth, R. L. Heath & S. Peal, *Soc.* **1942**, 55.

En 1948, *Swanson*<sup>1)</sup> annonçait que 80 % du glycogène pouvaient être scindés par l'action d'une *phosphorylase de muscle* deux fois cristallisée. Ceci semblait impossible car les chaînes terminales de ce polysaccharide ne représentent guère que les 40 à 45 % de son poids. En effet, *Hestrin*<sup>2)</sup> montrait l'année suivante que ce même enzyme, après 7 à 8 recristallisations successives, ne peut dégrader que 36 % du glycogène. Tout récemment, *G. Cori*<sup>3)</sup> trouve que la phosphorylase de muscle recristallisée une seule fois, contient encore une  $\alpha$ -1,6-glucosidase qui, scindant les embranchements, lui permettrait de poursuivre son action. Deux enzymes scindant les liaisons  $\alpha$ -1,6, une amyloglycosidase et une phosphorylase, avaient déjà été signalés par *Meyer* et coll.<sup>4)</sup> dans la levure.

Etudiant la dégradation enzymatique du glycogène, *G. Cori*<sup>5)</sup> distingue dans ce polysaccharide des « chaînes principales » sur lesquelles sont fixées des « chaînes secondaires » par l'intermédiaire de liaisons  $\alpha$ -1,6. La phosphorylase de muscle serait capable de dégrader les chaînes secondaires terminales jusqu'au glucose formant l'embranchement. Par contre, sur les chaînes principales, son action s'arrêterait avant l'embranchement, laissant intacts 5 ou 6 restes de glucose pouvant être encore dégradés par la  $\beta$ -amylase. La première dextrine obtenue pourrait encore servir d'initiateur de chaînes (starter) à l'action synthétique de la phosphorylase de muscle, mais elle perdrait cette propriété après action de la  $\beta$ -amylase. Ceci confirmerait que la phosphorylase de muscle a besoin d'un starter possédant une chaîne d'au moins 5 restes de glucose liés en  $\alpha$ -1,4<sup>6)</sup>.

La *phosphorylase de pomme de terre* agirait en principe d'une manière analogue. Avec cet enzyme, *Swanson*<sup>1)</sup> procède à 3 phosphorylèses successives suivies de dialyses et constate que la dextrine obtenue est attaquée par la  $\beta$ -amylase de blé qui libère encore 19 % de maltose. *Hassid*<sup>7)</sup> et coll., travaillant à de faibles concentrations de substrat, montrent que les limites de dégradation d'une amylopectine par arsénolyse et phosphorolyse sont respectivement de 54 et 60 %. Dans ce dernier cas, l'équilibre de la réaction est déplacé en faveur des produits de scission par l'emploi d'un excès de phosphate.

La phosphorylase de pomme de terre nécessite également un initiateur de chaînes pour synthétiser un polysaccharide<sup>8)</sup>. Mais con-

<sup>1)</sup> *M. A. Swanson*, *J. Biol. Chem.* **172**, 805 (1948).

<sup>2)</sup> *S. Hestrin*, *J. Biol. Chem.* **179**, 943 (1949).

<sup>3)</sup> *G. T. Cori & J. Larner*, *J. Biol. Chem.* **188**, 17 (1951).

<sup>4)</sup> *K. H. Meyer & P. Bernfeld*, *Helv.* **25**, 404 (1942).

<sup>5)</sup> *Loc. cit.*

<sup>6)</sup> *S. Hestrin*, *J. Biol. Chem.* **179**, 943 (1949); *M. A. Swanson & C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **172**, 815 (1948).

<sup>7)</sup> *M. Doudoroff, H. A. Barker & W. Z. Hassid*, *Nature* **161**, 96 (1948); *J. Katz & W. Z. Hassid*, *Arch. Biochem.* **30**, 275 (1951).

<sup>8)</sup> *C. S. Hanes*, *Nature* **145**, 348 (1940); *Proc. Roy. Soc. Lond.* **B 129**, 174 (1940).

trairement à ce qui se passe avec les phosphorylases animales<sup>1)</sup>, il suffit d'un oligosaccharide ne possédant que 3 restes de glucose pour amorcer la réaction<sup>2)</sup>. D'après *Swanson*<sup>3)</sup> puis *Hestrin*<sup>4)</sup>, la dextrine obtenue par action d'une  $\beta$ -amylase sur une amylopectine ne peut servir d'initiateur de chaînes. Par contre, *Peat et coll.*<sup>5)</sup> ont trouvé qu'une  $\beta$ -dextrine peut initier la réaction. Son pouvoir activateur est toutefois 10 fois plus faible que celui d'un amidon soluble.

Afin d'éclaircir ces problèmes, nous nous sommes proposé de déterminer, par des attaques enzymatiques poussées, la limite maximum de dégradation d'une amylopectine par la phosphorylase de pomme de terre. Nous avons vérifié premièrement si la dextrine obtenue pouvait encore être attaquée par la  $\beta$ -amylase, et deuxièmement si la phosphorylase était capable d'utiliser les différentes dextrans résiduelles, obtenues par ces 2 enzymes, comme initiateurs de chaînes pour la synthèse de polysaccharides.

*Enzymes.* La phosphorylase de pomme de terre (pdt) utilisée doit être aussi pure que possible, c'est-à-dire rigoureusement exempte de polysaccharides, d' $\alpha$ - ou de  $\beta$ -amylase et de tout enzyme pouvant scinder les liaisons  $\alpha$ -1,6 glucosidiques. Nous avons utilisé une phosphorylase de pdt à près de 70 % de pureté<sup>6)</sup>.

*L'unité de phosphorylase* (activité = A) est la quantité d'enzyme qui libère en 10 min. à 20°, 1  $\gamma$  de phosphore à partir d'une solution d'ester de *Cori* à 0,56 % et à pH 6,7, ceci en présence de fluorure et d'un initiateur de chaînes (glycogène). Lors de la lecture au photomètre, la quantité de phosphore libérée doit être comprise entre 10 et 60  $\gamma$ , correspondant à une transformation du substrat inférieure à 12 %. Le *degré de pureté* de l'enzyme est exprimé par le quotient de l'activité par rapport à l'azote (A/mgN).

*Contrôle de l'absence d'une glucose-1 phosphatase ou d'un initiateur de chaînes.* La phosphorylase, agissant sur de l'ester de *Cori* à pH 6,7, ne doit pas libérer de phosphore ni faire apparaître un polysaccharide donnant une coloration bleue avec l'iode.

*Contrôle de l'absence de l' $\alpha$ -amylase*<sup>7)</sup>. L'action prolongée de la phosphorylase sur un empois d'amidon ne doit provoquer aucune diminution de la viscosité en absence de phosphate.

1) *G. T. Cori & C. F. Cori*, J. Biol. Chem. **131**, 397 (1939); **135**, 733 (1940); *G. T. Cori, C. F. Cori & A. A. Green*, J. Biol. Chem. **151**, 39 (1943).

2) *C. Weibull & A. Tiselius*, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. **A 19**, No. 19 (1945); *M. A. Swanson & C. F. Cori*, J. Biol. Chem. **172**, 815 (1948); *E. J. Bourne, D. A. Silch & S. Peat*, Soc. **1949**, 1448.

3) Loc. cit.

4) Loc. cit.

5) *E. J. Bourne, D. A. Silch & S. Peat*, Soc. **1949**, 1448.

6) Produit préparé selon une prescription encore inédite. Le pourcentage est indiqué par rapport à notre meilleur produit, homogène à l'électrophorèse.

7) *P. Bernfeld & A. Meutémédian*, Helv. **31**, 1724 (1948).

*Contrôle de l'absence de  $\beta$ -amylase.* La phosphorylase en présence d'amylopectine et de tampon acétate à pH 4,7, ne doit pas causer une augmentation du pouvoir réducteur.

*Contrôle de l'absence d'un enzyme scindant les liaisons  $\alpha$ -1,6 glucosidiques.* Une dégradation arsénolytique et  $\beta$ -amylatique combinée d'une  $\beta$ -dextrine résiduelle ne doit libérer aucun groupe réducteur. La  $\beta$ -amylase utilisée dans ces essais doit naturellement être exempte d' $\alpha$ -amylase ou de tout enzyme scindant les ramifications.

*Dégradation des polysaccharides par les phosphorylases.* La réaction catalysée par la phosphorylase étant réversible en présence de phosphates, deux procédés peuvent être utilisés pour la déplacer en faveur de la scission des polysaccharides.

On peut comme *Hestrin*<sup>1)</sup> ajouter aux incubats de la phosphoglucomutase cristallisée<sup>2)</sup> qui transforme immédiatement le glucose-1-phosphate formé en glucose-6-phosphate, ce qui permet le dosage des groupes réducteurs libérés lors de la réaction. En absence d'une glucose-6-phosphatase ou de tout système enzymatique pouvant agir sur ce sucre, l'équilibre de la réaction est atteint lorsque 95,5% de l'ester de *Cori* ont été transformés en ester de *Robison*.

Nous avons préféré déplacer l'équilibre en substituant des arséniates<sup>3)</sup> aux phosphates, le glucose-1-arséniate formé étant aussitôt hydrolysé<sup>4)</sup>, ce qui permet de suivre par réductométrie la dégradation du polysaccharide.

*Dégradation comparée de l'amylopectine par arsénolyse et  $\beta$ -amylolyse.* Une solution d'amylopectine de waxy maïs purifiée<sup>5)</sup> et débarrassée de toute trace d'amylose<sup>6)</sup> est dégradée par un excès de phosphorylase en présence d'arséniate. Afin d'éviter une rétrogradation<sup>7)</sup>, la solution alcaline du polysaccharide est introduite goutte à goutte et sous agitation dans la solution d'enzyme fortement tempournée à pH 6,7. Un essai parallèle est effectué dans les mêmes conditions en présence de  $\beta$ -amylase (tampon acétate pH 4,7).

A des temps donnés, on détermine sur des prises le pourcentage de dégradation de l'amylopectine. Alors qu'avec la  $\beta$ -amylase la réaction atteint rapidement un palier à 70% de dégradation, lors de l'arsénolyse, on observe la formation d'un palier apparent lorsque 50% des liaisons glucosidiques ont été scindées. Nous avons attribué ce ralentissement, d'une part, à la baisse de l'affinité de la phosphorylase pour un polysaccharide de plus en plus dégradé, d'autre part,

<sup>1)</sup> S. Hestrin, J. Biol. Chem. **179**, 943 (1949).

<sup>2)</sup> V. A. Najjar, J. Biol. Chem. **175**, 281 (1948).

<sup>3)</sup> M. Doudoroff, H. A. Barker & W. Z. Hassid, Nature **171**, 96 (1948).

<sup>4)</sup> J. Katz & W. Z. Hassid, Arch. Biochem. **30**, 275 (1951).

<sup>5)</sup> K. H. Meyer & P. Rathgeb, Helv. **31**, 1724 (1948).

<sup>6)</sup> K. H. Meyer & G. C. Gibbons, Helv. **33**, 210 (1950).

<sup>7)</sup> K. H. Meyer & P. Gürtler, Helv. **30**, 751 (1947).

à la présence du glucose libéré au cours de la réaction et agissant comme inhibiteur compétitif. Cette inhibition a été étudiée et les résultats seront rapportés dans une prochaine publication.

Les solutions arsénolysées ont été portées à ébullition pour interrompre la réaction enzymatique, puis dialysées après centrifugation. La teneur exacte en polysaccharides est ensuite déterminée après hydrolyse acide, et la solution partagée en 2 portions sur lesquelles on effectue de nouvelles dégradations  $\beta$ -amylatiques et arsénolytiques dans les mêmes conditions (fig. 1).

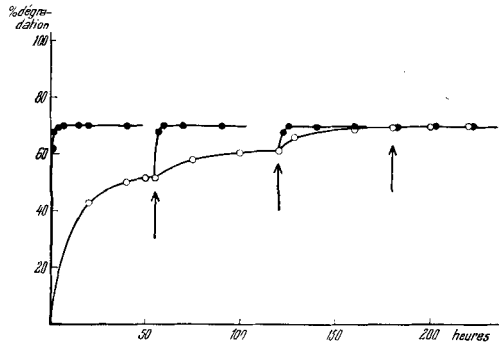


Fig. 1.

Dégradation de l'amylopectine de waxy maïs par:

—●— la  $\beta$ -amylase de blé;

—○— la phosphorylase de pdt.

Les flèches ( $\uparrow$ ) indiquent les rajonissements suivis de dialyse pour éliminer le glucose formé.

Il résulte de ces essais que les paliers obtenus par  $\beta$ -amylolyse sur les 3 dextrans atteignent toujours la même valeur (70% de dégradation), ce qui permet d'exclure une scission quelconque du polysaccharide au cours de ces différents traitements (chauffage, dialyse, alcalinisation). De plus, on voit qu'après 3 arsénolyses successives, la limite de dégradation est identique à celle obtenue par la  $\beta$ -amylase.

De mêmes expériences effectuées sur les amylopectines de pdt et de maïs ont abouti à des résultats semblables, avec palier à 70 et 62% de dégradation respectivement. Toutefois, ces valeurs ne doivent pas être considérées comme absolues, elles peuvent varier selon la provenance ou l'échantillon de l'amidon utilisé.

*Arsénolyse d'une amylopectine partiellement dégradée par la  $\beta$ -amylase.* Pour augmenter la précision des résultats, nous avons procédé comme suit: on soumet d'abord une solution de waxy maïs à l'action de la  $\beta$ -amylase. Lorsque les chaînes extérieures du polysaccharide sont en partie scindées (67,5% de la dégradation contre 70% pour une  $\beta$ -dextrine limite), on isole le polysaccharide qui ne contient plus que de très courtes chaînes.

Une solution concentrée de cette dextrine est ensuite soumise d'une part à une nouvelle attaque  $\beta$ -amylatique, d'autre part à l'action de la phosphorylase de pdt en présence d'arséniate. La fig. 2 montre qu'après 20 h. la différence des deux attaques n'est plus que de 1,7 %, calculée sur la dextrine, respectivement de 0,5 %, calculée sur l'amylopectine de départ.

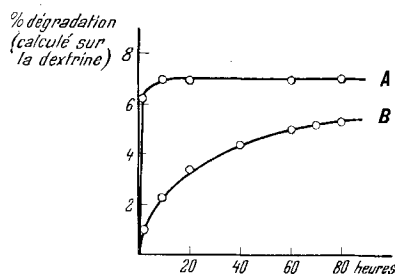


Fig. 2.

Dégradation d'une amylopectine déjà partiellement attaquée par la  $\beta$ -amylase, par:

- A la  $\beta$ -amylase de blé;
- B la phosphorylase de pdt.

*Précision et interprétation des résultats.* Lors des attaques enzymatiques des polysaccharides initiaux, la forte quantité de glucose libérée ne permet pas de déterminer, par réductométrie, le pourcentage de dégradation avec une précision supérieure à 1 %. Par contre, les attaques effectuées sur les dextrines (obtenues par arsénolyses ou  $\beta$ -amylolyses suivies de dialyses pour éliminer les sucres réducteurs formés) permettent facilement de déceler une différence de dégradation de 0,1 à 0,2 %, rapportée à l'amylopectine initiale.

L'amylopectine de waxy maïs sur laquelle nous avons travaillé possède un degré de polymérisation d'environ 2000, correspondant à un poids moléculaire de 340 000 environ. Cette amylopectine possédant environ 4 % de groupes terminaux (donc 4 % d'embranchements) sera formée d'environ 80 chaînes internes et externes<sup>1</sup>). Comme la  $\beta$ -amylase dégrade 70 % de ce polysaccharide, celui-ci devra posséder des chaînes externes d'au moins 18 restes de glucose et des chaînes internes de 7 restes au plus entre 2 embranchements, ceci lorsqu'on admet une structure statistique du polysaccharide. Ces valeurs correspondent bien à ce qui a été trouvé pour d'autres amylopectines<sup>2</sup>).

La  $\beta$ -dextrine résiduelle étant formée d'environ 600 restes de glucose, la scission d'un reste correspondra à une dégradation de 0,165 % (0,05 %, rapportée à l'amylopectine initiale). En effectuant, comme indiqué plus haut, des attaques enzymatiques comparées sur

<sup>1</sup>) Avec *Cori*, nous appelons «chaînes internes» les chaînes comprises entre 2 embranchements  $\alpha$ -1,6, et «chaînes externes» toutes les chaînes terminales.

<sup>2</sup>) *Kurt H. Meyer & M. Fuld, Helv. 24, 375 (1941).*

une telle dextrine, on pourra nettement suivre la dégradation à deux restes de glucose près.

Enfin, si l'un des deux enzymes devait dégrader les chaînes externes davantage que l'autre, en scindant un reste de glucose de plus par chaîne, on devrait observer une différence de dégradation de plus de 13 % de la dextrine. La différence de dégradation de 1,7 % trouvée par action de la  $\beta$ -amylase et de la phosphorylase de pdt sur la même amylopectine montre que ces 2 enzymes atteignent la même limite de dégradation.

*Comparaison des vitesses de dégradation par la  $\beta$ -amylase et par la phosphorylase.* Pour déterminer le rapport des deux vitesses, nous avons fait agir ces enzymes à leur pH optimum d'activité sur de l'amylopectine de waxy maïs d'une part et, d'autre part, sur un amidon traité selon *Zulkowski*<sup>1)</sup>. La fig. 3 rapporte les pourcentages de dégradation des substrats au cours du temps.

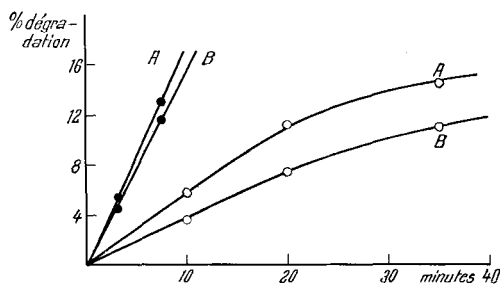


Fig. 3.

Comparaison des vitesses de dégradation d'un amidon préparé selon *Zulkowski* (A), et de l'amylopectine de waxy maïs (B), par :

- la  $\beta$ -amylase de blé: 7 A, corresp. à 0,025 mg d'enzyme pur.
- la phosphorylase de pdt: 2230 A, corresp. à 6,7 mg d'enzyme pur.

De ces différentes courbes, on peut déduire que la phosphorylase utilisée, d'un degré de pureté probable d'environ 70 % (1700 à 1800 A/mg N) dégrade l'amylopectine en présence d'arséniate 1100 fois plus lentement qu'un même poids de  $\beta$ -amylase de sweet potatoes cristallisé<sup>2)</sup>. Sur de l'amidon préparé selon *Zulkowski*, le rapport des deux vitesses est de l'ordre de 1 à 900. La phosphorylase étant environ 10 fois plus rapide que l'arsénolyse<sup>3)</sup> on peut dire qu'un même poids de  $\beta$ -amylase dégrade ces polysaccharides environ 100 fois plus rapidement que notre phosphorylase.

<sup>1)</sup> Préparé par M. R. Menzi dans nos laboratoires.

<sup>2)</sup> A. K. Balls, R. R. Thompson & M. K. Walden, J. Biol. Chem. **163**, 571 (1946); **173**, 9 (1948).

<sup>3)</sup> Voir une prochaine communication.

*Effet starter de la dextrine résiduelle.* Les phosphorylases agissant d'une manière réversible et notre phosphorylase de pdt pouvant dégrader l'amylopectine au même point que la  $\beta$ -amylase, une  $\beta$ -dextrine limite devrait nécessairement pouvoir lui servir de starter.

Afin de confirmer ceci, nous avons préparé une dextrine en soumettant une solution d'amylopectine de waxy maïs à deux attaques  $\beta$ -amylatiques successives, interrompues par un rajeunissement. Un contrôle effectué en soumettant cette dextrine à une troisième attaque  $\beta$ -amylatique n'a montré aucune variation du pouvoir réducteur.

Une solution de cette dextrine a été mise en contact avec de la phosphorylase de pdt en présence d'ester de *Cori*. En mesurant le phosphore libéré en fonction du temps, on obtient les courbes rapportées dans la fig. 4.

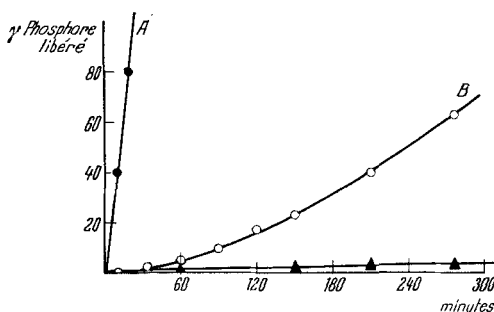


Fig. 4.

Effet starter sur la phosphorylase de pdt  
 ● ● de l'amylopectine de waxy maïs  
 ○ ○ de la  $\beta$ -dextrine résiduelle;  
 ▲ ▲ témoin: phosphorylase + ester de *Cori*,  
 mais sans adjonction de polysaccharide.

On constate que la  $\beta$ -dextrine limite peut effectivement servir d'initiateur de chaînes à la phosphorylase de pdt. La libération de phosphore, très lente au début, augmente au fur et à mesure de l'allongement des chaînes. On peut donc dire que l'affinité de l'enzyme pour le polysaccharide est fonction de la longueur de ces chaînes: très faible pour une dextrine résiduelle, elle est maximum pour une amylopectine intacte.

#### Discussion.

Il est évident que les chaînes terminales des polysaccharides sont formées soit d'un nombre pair, soit d'un nombre impair de restes de glucose et ceci dans une proportion égale. Or, la  $\beta$ -amylase ne pouvant scinder qu'une liaison sur deux à partir des extrémités non réductrices des chaînes (libération de maltose), la limite de dégradation sera différente pour une chaîne impaire (Fig. 5, a) ou paire (Fig. 5, b).



Dans le premier cas, il ne restera sur la «chaîne secondaire» qu'un seul reste de glucose. Dans le second, la  $\beta$ -amylase ne pouvant scinder la liaison  $\alpha$ -1,6 de l'embranchement, est obligée de laisser 2 restes de glucose liés en  $\alpha$ -1,4. En moyenne, pour 2 branches terminales dégradées, il doit subsister 3 restes de glucose<sup>1)</sup>.

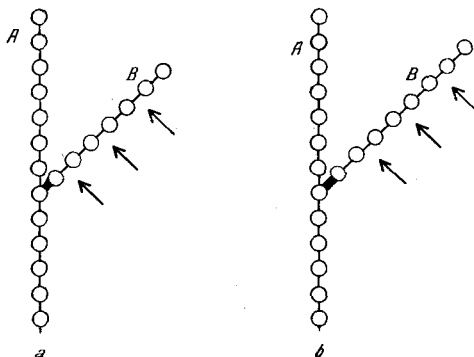


Fig. 5.

Schéma d'une branche terminale ramifiée de l'amylopectine. A: chaîne principale, B: chaîne secondaire;  $\circ$  reste de glucose lié par une liaison  $\alpha$ -1,4 glucosidique;  $\bullet$  reste de glucose lié par une liaison  $\alpha$ -1,6 glucosidique; ( $\uparrow$ ) points d'attaque par la  $\beta$ -amylase.

La phosphorylase de pdt par contre, scindant un à un les restes de glucose, n'est en rien limitée par la parité des chaînes externes et devrait donc dégrader le polysaccharide davantage que la  $\beta$ -amylase. Or nous n'avons trouvé pratiquement aucune différence de dégradation pour ces 2 enzymes. Ce résultat différencie nettement la phosphorylase de pdt de la phosphorylase de muscle étudiée par *Cori*.

## Partie expérimentale.

### Solutions employées.

1. *Solution de phosphorylase de pommes de terre.* Le jus de pdt est purifié par 6 précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium, les 3 dernières étant effectuées sur des solutions  $\frac{3}{4}$  saturées en  $\text{NaCl}^2$ ). La solution obtenue a un degré de pureté de 1500 A/mgN environ et montre à l'électrophorèse une pureté de 60 à 70%. Conservée à froid sous quelques gouttes de toluène, elle est stable.

2. *Solution d'arséniate molaire.* 6,64 g d'ac. pyroarsénique sont dissous à chaud dans un peu d'eau. La solution est portée à pH 6,7 par la soude concentrée et complétée à 50 cm<sup>3</sup>.

3. *Solution d'amylopectine.* Les amylopectines de pdt, de maïs et de waxy maïs ont été préparées d'après les prescriptions de *Meyer & Rathgeb*<sup>3)</sup> et débarrassées de l'amylose d'après la méthode de *Meyer & Gibbons*<sup>4)</sup>. La poudre qu'on obtient après précipitation acétonique et lavage à l'éther sert de matériel de départ. 2,2 g de cette poudre sont dissous à chaud dans 200 cm<sup>3</sup> d'eau et alcalinisés à pH 10, par de la soude diluée. La teneur exacte

<sup>1)</sup> K. H. Meyer, M. Wertheim & P. Bernfeld, *Helv.* **24**, 212 (1941).

<sup>2)</sup> Préparés selon une prescription encore inédite.

<sup>3)</sup> K. H. Meyer & P. Rathgeb, *Helv.* **31**, 1533 (1948).

<sup>4)</sup> K. H. Meyer & G. C. Gibbons, *Helv.* **33**, 210 (1950).

en polysaccharides de cette solution est déterminée, après hydrolyse acide, par dosage du glucose formé suivant la méthode de *Noelting & Bernfeld*<sup>1)</sup>. La concentration varie de 1,07 à 1,14%. La solution est additionnée de quelques gouttes de toluène et stockée à 0°.

*Dosage d'activité de la phosphorylase.*

*Substrat:* 400 mg de glycogène sont dissous à chaud dans environ 15 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute 700 mg de glucose-1-phosphate (sel dipotassique à 2 H<sub>2</sub>O soit 1,93 m moles) préparé selon *McCready & Hassid*<sup>2)</sup>, 42 mg de fluorure de sodium et 2 cm<sup>3</sup> de tampon acétique molaire de pH 6,7, et complète la solution à 100 cm<sup>3</sup>.

*Incubation:* On laisse agir 0,5 cm<sup>3</sup> de 1 (de 20 à 100 unités) sur 2 cm<sup>3</sup> de substrat, pendant 10 min. à 20°. La solution incubée contient 1,12% d'ester de *Cori*, 0,64% de polysaccharides, de 0,02 à 0,04% de phosphorylase. Sa concentration en NaF est de 0,008-m., et de 0,016-m. en tampon acétate. On arrête la réaction par 2 cm<sup>3</sup> d'ac. trichloracétique à 10%. On filtre la solution et dose le phosphore libéré sur 2 cm<sup>3</sup> de filtrat, selon la méthode de *Fiske & Subbarow*<sup>3)</sup> modifiée par *King*<sup>4)</sup>. La lecture s'effectue contre un blanc (substrat + ac. trichloracétique + phosphorylase ajoutée en dernier) au photocolimètre de *Klett-Summerson* avec le filtre rouge K 66.

*Dégradation arsénolytique:* Dans un erlenmeyer rodé placé dans un thermostat à 30° et contenant 4 cm<sup>3</sup> de 1 (activité totale: 15000 unités) et 10 cm<sup>3</sup> de 2, on laisse couler goutte à goutte 100 cm<sup>3</sup> de 3. Le glucose formé est dosé après 0,1, 6, 12, 24 et 48 h. sur des prises que l'on dilue de 1 à 10. L'arséniate n'influence pas les dosages. Des valeurs trouvées, on déduit celle d'un blanc provenant d'une prise sur un incubat identique mais dans lequel l'activité de la phosphorylase a été préalablement détruite par la chauffe. Cette valeur doit être négligeable.

*Élimination des protéines et du glucose après arsénolyse:* L'erlenmeyer contenant la solution incubée est plongé dans de l'eau bouillante pendant quelques min. jusqu'à floculation des protéines. La solution (environ 100 cm<sup>3</sup>) est centrifugée, puis dialysée dans un tube de cellophane<sup>5)</sup> contre 4 l d'eau distillée que l'on change toutes les 6 h. environ. Après 48 h. les 98% du glucose ont dialysé. La teneur en dextrine de cette solution est déterminée en dosant le glucose avant et après hydrolyse acide.

La dégradation  $\beta$ -amylatique est effectuée, dans les conditions de *Meyer & Gürtler*<sup>6)</sup>.

*Effet starter de la  $\beta$ -dextrine.*

*Solution de dextrine résiduelle:* Elle est préparée suivant la méthode de *Noelting & Bernfeld*<sup>1)</sup> à partir d'une amylopectine exempte d'amylose. 100 mg de dextrine sont dissous à chaud et portés à 100 cm<sup>3</sup>.

On vérifie sur 1 cm<sup>3</sup> de cette solution qu'aucun groupe réducteur n'est libéré par une nouvelle attaque  $\beta$ -amylatique.

*Substrat:* 350 mg de glucose-1-phosphate, 20 mg de fluorure de sodium et 2 cm<sup>3</sup> de tampon acétique normal à pH 6,7 sont portés à 50 cm<sup>3</sup>. Le glucose-1-phosphate ne contient pas de polysaccharide, sa teneur en phosphate minéral est inférieure à 0,5%.

*Mode opératoire:* Dans 3 erlenmeyers contenant resp. 4 cm<sup>3</sup> d'eau, 4 cm<sup>3</sup> de la solution 3 et 4 cm<sup>3</sup> de la solution de  $\beta$ -dextrine résiduelle, on ajoute d'un coup 10 cm<sup>3</sup> d'un mélange de 32 cm<sup>3</sup> du substrat et 0,5 cm<sup>3</sup> de la solution 1 (activité: 2200 A/cm<sup>3</sup>). De trente en trente min., on prélève 1 cm<sup>3</sup> et détermine la quantité de phosphore libérée, après addition de 1 cm<sup>3</sup> d'ac. trichloracétique à 10%.

Nous exprimons notre reconnaissance au «Fonds d'encouragement des recherches scientifiques», ainsi qu'à la «Fondation Rockefeller» pour leur aide généreuse.

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

2) *H. M. McCready & W. Z. Hassid*, *Am. Soc.* **66**, 560 (1944).

3) *C. H. Fiske & Y. Subbarow*, *J. Biol. Chem.* **81**, 629 (1928).

4) *J. King*, *Biochem. J.* **26**, 292 (1932).

5) *The Visking Corporation*, Chicago.

6) *K. H. Meyer & P. Gürtler*, *Helv.* **30**, 751 (1947).

## SUMMARY.

1. The comparative degradation of amylopectin by potato phosphorylase and wheat- $\beta$ -amylase have been performed.

2. After 3 successive arsenolyses, the same limit of degradation was obtained as with  $\beta$ -amylase. Each enzymatic attack was followed first by a dialysis to eliminate the glucose formed which acts as a competitive inhibitor, then by rejuvenation of the dialysed dextrin. The dextrans obtained were again attacked by phosphorylase and  $\beta$ -amylase until a final limit was attained. In the case of phosphorylase the reaction rate diminishes considerably as the degradation proceeds indicating a decrease of affinity towards the substrate.

3. Identical results have been obtained on an amylopectin partially degraded by  $\beta$ -amylase.

4. By unit of weight, potato phosphorylase degrades (arsenolysis) waxy maïs amylopectin 1,100 times less rapidly than crystalline sweet potato  $\beta$ -amylase. Its action on *Zulkowski's* soluble starch is 900 times slower.

5. A waxy maïs limit  $\beta$ -dextrin may serve as a starter for potato phosphorylase. The initial speed of reaction however is 100 times slower than for the same weight of intact amylopectin. This also shows that the affinity of the enzyme depends largely on the chain length of the outer branches of the polysaccharide.

6. Results obtained indicate that the degradation pattern of potato phosphorylase differs considerably from that of muscle phosphorylase.

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

## 32. Propriétés de la $\beta$ -amylase de malt. Sur les enzymes amylolytiques 21<sup>1)</sup>

par A. Piguet et Ed. H. Fischer.

(14 XII 51)

Dans un précédent travail<sup>2)</sup>, nous avons décrit la purification et la cristallisation de la  $\beta$ -amylase de malt. Nous décrivons ici les propriétés de cet enzyme.

### *Propriétés de l'enzyme pur.*

*Nature protéique:* l'enzyme donne les réactions habituelles des protéines. Sa teneur en azote (*Kjeldahl*) est de 14,1%. Il est exempt de sucre ou de polysaccharide<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Précédente communication: *Helv.* **35**, 247 (1952).

<sup>2)</sup> *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & A. Piguet, Helv.* **34**, 316 (1951).