

## PURIFICATION PARTIELLE ET PROPRIÉTÉS DES AMYLASES DE LA POIRE

J. C. PECH, G. BONNEAU et J. FALLOT

Laboratoire de Technologie végétale, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 31-Toulouse, France

(Reçu le 7 juillet 1972. Accepté le 15 août 1972)

**Key Word Index**—*Pyrus communis*; Rosaceae; pear;  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases; purification and properties.

**Abstract**—Three amylases E1, E2 and E3 have been extracted from Passe-Crassane pears pulp and partially purified. A good extraction of these enzymes is obtained only with non ionic detergents. Furthermore, solubilization of amylase E1 needs the use of these compounds. Separation of the 3 amylases is obtained by chromatography on Sephadex G100. E1 and E2 are  $\beta$ -amylases whereas E3 is an  $\alpha$ -amylase. The first two have similar kinetic properties and interconversion of one form into the other is possible. It is suggested that the insoluble form E1 is the result of the association of  $\beta$ -amylase E2 with other compounds present in the fruit.

**Résumé**—Trois amylases E1, E2 et E3 ont été extraites de la pulpe de poires Passe-Crassane et purifiées partiellement. Une bonne extraction des enzymes nécessite l'utilisation de détergents non ioniques. L'obtention de l'amylase E1 est d'ailleurs liée à l'emploi de ces composés. La séparation des 3 amylases est possible sur Sephadex G100. E1 et E2 sont des  $\beta$ -amylases, alors que E3 correspond à une  $\alpha$ -amylase. Les deux premières ont des propriétés cinétiques très voisines et sont interconvertibles; il s'agit peut-être de la même enzyme dont la forme insoluble E1 résulterait de l'association de la  $\beta$ -amylase avec d'autres composés du fruit.

### INTRODUCTION

L'HYDROLYSE de l'amidon est un phénomène essentiel de la maturation de nombreux fruits, tels que la pomme et la poire.<sup>1,2</sup> Malgré leur rôle important dans la biochimie de la maturation, les enzymes amylolytiques sont peu connues et n'ont pas été séparées ni purifiées.<sup>3,4</sup> Ainsi, dans les travaux de McArthur-Hespe,<sup>5</sup> l'activité des amylases a été étudiée dans des extraits de poire n'ayant subi aucune purification préalable. Les premières recherches sur la séparation des amylases de la pomme<sup>6</sup> à l'aide de filtration sur Sephadex G200 ou de chromatographie sur DEAE cellulose ont conduit à des résultats négatifs.

Les difficultés rencontrées dans de telles études sont vraisemblablement dues aux problèmes posés par l'extraction, maintes fois soulignés par divers auteurs.<sup>2,7,8</sup>

Grâce à des méthodes appropriées, des travaux récents ont permis la séparation et la mise en évidence des amylases de fruits en gel de polyacrylamide.<sup>9,10</sup> En outre, les amylases de la poire Passe Crassane ont pu être caractérisées.<sup>11</sup>

<sup>1</sup> R. ULRICH, *La Vie des Fruits*, p. 222, Masson, Paris (1952).

<sup>2</sup> A. C. HULME, *Adv. Food. Res.* **8**, 297 (1958).

<sup>3</sup> R. ULRICH et C. HARTMANN, *Ann. Nutrit. Aliment* **21**, 161 (1967).

<sup>4</sup> D. R. DILLEY, dans *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, Vol. 1, p. 179, Academic Press, New York (1970).

<sup>5</sup> G. W. F. M. MCARTHUR-HESPE, *Acta Bot. Neerl.* **5**, 200 (1956).

<sup>6</sup> Y. T. PAN et H. V. MARSH, JR., *Plant Physiol.* **44**, suppl. (1969).

<sup>7</sup> R. E. YOUNG, *Arch. Biochem. Biophys.* **3**, 174 (1965).

<sup>8</sup> J. D. JONES, A. C. HULME et L. S. C. WOOLTORTON, *Phytochem.* **4**, 659 (1965).

<sup>9</sup> J. C. PECH, C. BARDET et J. FALLOT, *Ann. Technol. Agric.* **19**, 311 (1970).

<sup>10</sup> R. L. CLEMENTS, dans *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, Vol. 1, p. 159, Academic Press, New York (1970).

<sup>11</sup> J. C. PECH, G. BONNEAU et J. FALLOT, *Compt. Rend.* **273**, 175 (1971).

Cette étude porte sur les conditions de l'extraction des amylases de la poire Passe Crassane, la purification partielle de celles-ci et la description de leurs propriétés.

## RESULTATS

### *Extraction en Présence ou en l'Absence de Polymères ou de Détergents Non Ioniques*

La filtration sur Sephadex G100 d'extraits obtenus avec le milieu de base seul ou additionné de polymères (Carbowax 4000) révèle l'existence de deux fractions amylasiques E2 et E3 (Tableau 1). Lorsqu'un détergent non ionique (Cemulsol NPT 10) est utilisé, une amylase supplémentaire E1 apparaît. Il a été démontré précédemment que E1 et E2 correspondent à des  $\beta$ -amylases et E3 à une  $\alpha$ -amylase.<sup>11</sup>

TABLEAU 1. ACTIVITE DES AMYLASES EXTRAITES DANS DIVERSES CONDITIONS EN  $\mu\text{g}$  DE MALTOSE  $\times 10^3$  LIBERES PAR MIN PAR g DE MATIERE FRAÎCHE

Enzymes	Conditions d'extraction					
	Milieu de base		Carbowax 4000 (4%)		Cemulsol NPT 10 (0,5%)	
	Surnageant	Culot repris par Cemulsol NPT 10	Surnageant	Culot repris par Cemulsol NPT 10	Surnageant	Culot repris par Cemulsol NPT 10
$\beta$ -Amylase E1	0	330	0	420	540	A.n.d.
$\beta$ -Amylase E2	60	520	290	140	900	A.n.d.
$\alpha$ -Amylase E3	16	50	140	14	160	A.n.d.

A.n.d. = Activité non dosable, inférieure à 10 unités.

En présence de polymères (Carbowax 4%, Polyclar AT 2% ou Polyvinylpyrrolidone 2%), les fractions obtenues sont d'une façon générale beaucoup moins actives qu'en présence de détergents. Parmi ces derniers, utilisés à 0,5%, le Cemulsol NPT 10 s'est montré supérieur au Tween 80 et au Triton X100.

Après une première extraction sans détergent, la  $\beta$ -amylase E1 peut-être libérée en soumettant les culots de centrifugation à une deuxième extraction en présence de Cemulsol NPT 10 par exemple (Tableau 1). L'obtention sous forme soluble de l'enzyme E1 est donc liée à l'utilisation d'un détergent.

### *Chromatographie sur Gels de Nature Différente*

Lors de la filtration sur Sephadex G100, gel de dextrans, les trois amylases sont nettement séparées, alors qu'elles ne le sont pratiquement pas sur Biogel P100, gel de polyacrylamide (Fig. 1). Dans ce dernier cas, en effet, l' $\alpha$ -amylase E3 n'apparaît pas. Il est à remarquer que le volume d'élution de la  $\beta$ -amylase E1 reste inchangé dans les deux cas. Ce phénomène de rétention des amylases sur gels de Sephadex, déjà signalé pour l'amylase pancréatique<sup>12</sup> permet une meilleure séparation et une purification plus poussée des enzymes étudiées ici.

### *Purification Partielle*

Le protocole de purification est donné dans la Expérimentale. L'élution des enzymes sur DEAE Sephadex donne une seule fraction active qui, filtrée sur Sephadex G100 est séparée

<sup>12</sup> B. GELOTTE, *Acta Chem. Scand.* **18**, 1283 (1964).

en deux enzymes E1 et E2. La fraction E3, faible et perdant pratiquement toute activité lors du passage sur DEAE Sephadex, est obtenue par passage direct sur Sephadex G100.

Au cours de la purification, l'activité spécifique de E1, E2 et E3 exprimée par rapport aux protéines est multipliée par 1,7, 11,7 et 5,5 respectivement. L'enrichissement calculé par rapport aux sucres et aux phénols est beaucoup plus grand (Tableau 2). La fraction E1 est la plus riche en polysaccharides et en phénols. C'est l'enzyme E2 qui a toujours l'activité spécifique la plus élevée.

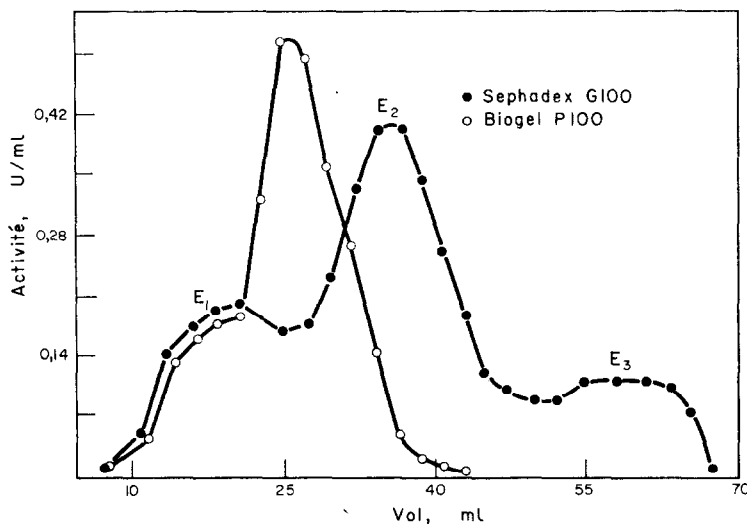


FIG. 1. ACTIVITE AMYLASIQUE D'UN EXTRAIT DE POIRE APRES FILTRATION SUR SEPHADEX G100 ET BIOGEL P100. LA CAPACITE DES DEUX COLONNES EST CALCULEE DE FAÇON QUE LE VOLUME MORT SOIT LE MEME DANS LES DEUX CAS.

TABLEAU 2. PURIFICATION PARTIELLE DES AMYLASES DE LA POIRE PASSE-CRASSANE

Extrait	Vol. (ml)	Activité (U/ml)	Prot. (mg/ml)	Sucres (mg/ml)	Phén. (mg/ml × 10 <sup>3</sup> )	Activités			
						U/mg Prot.	U/mg sucres	U/mg Phén.	
I	950	0,44	0,71	121	16	0,6	0,004	27	
II	1360	0,28	0,23	0,53	5	1,2 (× 2)	0,53 (× 132)	56 (× 2)	
III	210	0,68	0,13	0,59	3	5,2 (× 8,7)	1,1 (× 275)	226 (× 8,3)	
IV ↗	E <sub>1</sub>	48	0,27	0,28	1,9	4,2	1,0 (× 1,7)	0,14 (× 35)	67 (× 2,5)
	E <sub>2</sub>	75	1,13	0,16	0,47	1,3	7,0 (× 11,7)	2,4 (× 600)	1130 (× 42)
V →	E <sub>3</sub>	35	0,10	0,03	0,05	0,24	3,3 (× 5,5)	2,0 (× 500)	400 (× 15)

### Propriétés

L' $\alpha$ -amylase a un pH optimum voisin de 5,5 dans le tampon phosphate acide citrique de McIlvaine dilué 5 fois en présence de  $10^{-5}$  M  $\text{CaCl}_2$ . L'activité n'est plus que de 75% à pH 4,6 et de 62% à pH 6,2. L'activité des deux  $\beta$ -amylases est beaucoup moins pH-dépendante puisque dans les mêmes conditions, l'activité ne descend jamais en dessous de 80%

dans une zone de pH comprise entre 3,4 et 7,8. Cependant, lorsqu'on augmente la force ionique du tampon (McIlvaine non dilué), un pH optimum nettement marqué apparaît aux environs de 6,5-7,0.

Les différentes fractions ont une activité qui varie linéairement dans les limites de teneurs en protéines étudiées: 1,6-32  $\mu\text{g}$  pour E1, 2,8-56  $\mu\text{g}$  pour E2 et 0,8-16  $\mu\text{g}$  pour E3 (teneurs exprimées pour 0,4 ml de milieu réactionnel).

Le  $K_m$  et la vitesse maximum de la réaction ( $V_m$ ) ont été déterminés pour chacune des  $\beta$ -amylase, à un pH optimal et à un pH sous optimal (Tableau 3). Il est remarquable de constater que les enzymes E1 et E2 ont un  $K_m$  très voisin. De plus, la vitesse maximum augmente dans les mêmes proportions lorsqu'on passe de pH 3,4-5,5.

TABLEAU 3. PROPRIÉTÉS DES AMYLASES DE LA POIRE EN PRÉSENCE D'AMIDON SOLUBLE ZULKOWSKY

pH	Enzyme	$K_m$ (g/ml)	$V_m$ ( $\mu\text{mol}$ maltose libérés par min)	$V_m$ rel.
3,40	$\beta$ -Amylase E1	$3,2 \times 10^{-3}$	$0,9 \times 10^3$	100
	$\beta$ -Amylase E2	$2,8 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^3$	100
5,5	$\beta$ -Amylase E1	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^3$	110
	$\beta$ -Amylase E2	$1,7 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^3$	112
	$\alpha$ -Amylase E3	$3,4 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^3$	—

Incubation à 30° dans le tampon de Mc Ilvaine dilué 5 fois et en présence de  $10^{-5}$  M  $\text{CaCl}_2$  pour l' $\alpha$  amylase.

Les trois enzymes ont un optimum d'activité nettement marqué aux alentours de 45°. Cependant, leur thermosensibilité est différente selon les enzymes considérées. En effet, après action d'une température de 60° pendant 10 min, les  $\beta$ -amylases E1 et E2 perdent 95 % de leur activité, alors que l' $\alpha$ -amylase E3 n'en perd que 45 %.

Les enzymes E1 et E2 sont fortement inhibées (86 et 100 % respectivement) par  $\text{HgCl}_2$  à une dose de  $2 \times 10^{-6}$  M alors que l' $\alpha$ -amylase E3 ne perd que 14 % de son activité. L'EDTA, à la dose de  $10^{-2}$  M ne réduit pratiquement pas l'activité des enzymes E1 et E2; par contre, l' $\alpha$ -amylase est inhibée à plus de 96 %.

#### *Action sur les $\beta$ -Dextrines Limites et sur l'Amylopectine Azure*

Seule l'amylase E3 s'est montrée active sur les  $\beta$ -dextrines limites issues de l'hydrolyse de l'amidon par des  $\beta$ -amylases de patate douce;<sup>13</sup> ceci confirme sa nature  $\alpha$ -amylasique. De plus, l'amylpectine azure<sup>14</sup> peut être hydrolysée par cette enzyme.

#### *Possibilités d'Interconversion des deux $\beta$ -Amylases*

$660 \times 10^{-3}$  unités de  $\beta$ -amylase E2 purifiée sont mises en contact pendant 10 min à 4° avec un broyat cellulaire de pulpe bouillie. Après extraction en présence de Tween 80 et passage sur une colonne de Sephadex G100, la majeure partie de l'enzyme est retrouvée à l'état de E2 ( $455 \times 10^{-3}$  unités); mais en outre, une activité amylasique appréciable est décelée à l'emplacement de la  $\beta$ -amylase E1 ( $70 \times 10^{-3}$  unités). Le contact de la  $\beta$ -amylase E2 avec les constituants du fruit crée donc une nouvelle enzyme qui pourrait correspondre à E1. Il a été démontré que la seule action du détergent ne suffit pas à provoquer cette transformation.

<sup>13</sup> Y. SHAIN et A. M. MAYER, *Physiol. Plantarum* **21**, 765 (1968).

<sup>14</sup> H. RINDERKNECHT, P. WILDING et B. J. HAVERBACK, *Experientia* **23**, 805 (1967).

La même expérience effectuée avec de la  $\beta$ -amylase de patate douce ne nous a donné aucune modification de l'enzyme initiale; une seule fraction a été observée lors de la filtration sur Sephadex G100 avant et après mise en contact avec de la pulpe de poire bouillie.

Signalons de plus que l'amylase E2 est éluée en une seule fraction sur Sephadex G100 après mise en contact avec de l'amidon insoluble puis extraction dans les mêmes conditions que lors des expériences précédentes.

Enfin, après un séjour de 3 semaines environ à 4°, la  $\beta$ -amylase E1 purifiée acquiert un comportement électrophorétique identique à celui de E2. Ces faits semblent confirmer la possibilité d'interconversion de E1 et E2.

## DISCUSSION

La poire Passe Crassane contient 3 fractions amylasiques: 2  $\beta$ -amylases E1 et E2 et 1  $\alpha$ -amylase E3. La  $\beta$ -amylase E1 ne peut être solubilisée que par des détergents. Il semble d'après les résultats obtenus dans cette étude, qu'elle pourrait correspondre à une association de la  $\beta$ -amylase soluble (E2) avec un ou plusieurs composés contenus dans le fruit (phénols, polysaccharides ou protéines).

L'insolubilisation d'enzymes par des *composés phenoliques* a été observée par différents auteurs lors de l'extraction de diverses enzymes de fruits.<sup>7,15</sup> L'invertase insoluble du raisin peut être obtenue sous forme soluble si le milieu d'extraction contient un agent protecteur contre les phénols (Carbowax en particulier).<sup>15</sup> Si l'on retient cette hypothèse l'addition de polymères tels que Carbowax ou polyvinylpyrrolidone, devrait empêcher au moins en partie la formation de tels complexes. Or, après extraction en présence de ces composés, on n'obtient jamais une activité amylasique E1 détectable. Il semblerait donc que les composés phénoliques ne soient pas seuls en cause dans le cas présent.

L'amylase peut s'associer à des *polysides*, soit *in vivo*, soit au cours de l'extraction. L'existence de complexes amylases-substrat est connue; leur formation est d'ailleurs mise à profit pour la purification de ces enzymes.<sup>16</sup> La non rétention de E1 lors de la filtration sur Sephadex G100 pourrait être due au fait que cette enzyme est déjà liée à un polysaccharide. Cependant, la mise en contact de l'amylase E2 avec de l'amidon ne crée pas, dans les conditions utilisées, de complexe insoluble.

On peut aussi penser à une *association d'unités enzymatiques* du même type que celle étudiée par Harel et Mayer<sup>17</sup> pour la catechol oxydase de la pomme. La possibilité d'interconversion des deux amylases ne permet pas de rejeter cette hypothèse.

Il est possible enfin que la  $\beta$ -amylase E1 corresponde à un complexe *enzyme-protéine*. On sait que dans le grain de blé, par exemple il existe une  $\beta$ -amylase 'latente' liée à la gluténine.<sup>18</sup> La solubilisation de cette enzyme est obtenue en ajoutant au milieu d'extraction du sulfite de sodium ou des thiols. Dans notre cas, la présence de tels composés (mercapto-éthanol) ne suffit pas à solubiliser la  $\beta$ -amylase insoluble. Toutefois, il a été établi que le complexe insoluble  $\beta$ -amylase de blé-gluténine réalisé artificiellement est pratiquement indissociable par les agents réducteurs cités plus haut.<sup>19</sup> L'existence chez la poire d'une structure amylase-protéine 'solubilisable' par les détergents n'est donc pas à écarter,

<sup>15</sup> J. S. HAWKER, *Phytochem.* **8**, 337 (1969).

<sup>16</sup> E. N. J. JASPARS et H. VELDSTRA, *Physiol. Plantarum* **18**, 604 (1965).

<sup>17</sup> E. HAREL et A. M. MAYER, *Phytochem.* **7**, 199 (1968).

<sup>18</sup> E. V. ROWSELL et L. J. GOAD, *Biochem. J.* **84**, 73 (1962).

<sup>19</sup> J. A. ROTHFUS et S. J. KENNEL, *Cereal Chem.* **47**, 140 (1970).

d'autant plus que la  $\beta$ -amylase 'zymogénique' du grain d'orge peut être solubilisée par des agents de dissociation tels que l'urée ou le Triton X100.<sup>20</sup>

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou non les diverses hypothèses. L'augmentation d'activité spécifique des amylases obtenue par les processus de purification utilisés ici est faible si on la compare à celle obtenue par d'autres auteurs pour d'autres enzymes de fruits;<sup>21,22</sup> mais elle est du même ordre que celle réalisée sur des amylases d'autres végétaux.<sup>23</sup>

Signalons enfin que les amylases de certains organes ne sont pas responsables de l'hydrolyse de l'amidon présent dans les tissus. Il en est ainsi de la tige de vigne.<sup>24</sup> D'autres enzymes peuvent intervenir, en particulier la phosphorylase qui a d'ailleurs été mise en évidence chez la pomme par Clements.<sup>10</sup> Mais dans ce dernier cas également, l'activité *in vivo* de l'enzyme n'est pas démontrée. Il serait donc important, à la lumière des travaux de Buttrose,<sup>24</sup> de rechercher par des méthodes microscopiques, si la dissolution des grains d'amidon chez les fruits a lieu par un processus de 'corrosion' (amylases) ou par un processus inverse de 'l'apposition' (autres enzymes).

Le devenir des sucres simples formés par hydrolyse de l'amidon est également obscur. En effet, on sait qu'à l'amylolyse ne correspond pas toujours une augmentation simultanée des sucres réducteurs.<sup>2</sup> De tels travaux sont actuellement en cours et devraient permettre de mieux comprendre les phénomènes d'amylolyse chez les fruits.

## EXPÉRIMENTALE

**Matériel.** Les poires Passe-Crassane récoltées le 15 octobre ont été conservées en chambre froide à 4° jusqu'au 8 mars, date à laquelle elles ont atteint l'état de maturité gustative. Les analyses ont été effectuées sur des tranches de pulpe lyophilisée.

**Dosage des amylases.** L'incubation d'une durée de 1 h à 30° a lieu dans le tampon de McIlvaine (phosphate-acide citrique) à pH 6,0 contenant du  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-5}$  M) et de l'amidon soluble Zulkowsky Merck (2,5%). L'activité amylasique est appréciée en dosant les sucres réducteurs libérés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique de Bernfeld<sup>25</sup> modifiée par Jaspars et Veldstra.<sup>16</sup> Dans l'extrait brut, la présence de quantités très élevées de sucres réducteurs interférant avec le réactif utilisé diminue la précision du dosage. C'est pourquoi dans ce cas, la durée d'incubation a été portée à 3 h afin d'augmenter la précision des mesures. Les méthodes consistant à évaluer l'amidon hydrolysé par iodométrie<sup>13</sup> se sont montrées peu sensibles et peu précises.

**Méthodes analytiques.** L'azote protéique est dosé après précipitation par l'acide trichloracétique et minéralisation<sup>26</sup> par la méthode de Johnson.<sup>27</sup> La concentration en protéines est obtenue en multipliant par 6,25 la teneur en azote. Les phénols totaux sont évalués par la méthode de Swain et Hillis<sup>28</sup> modifiée par Goldstein et Swain<sup>29</sup> et les sucres et polysaccharides par la technique décrite par Dubois *et al.*<sup>30</sup>

**Purification. 1ère étape—Extraction.** L'extraction est effectuée à basse température (0–4°) selon la technique déjà décrite<sup>31</sup> à l'aide du milieu de base suivant: Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA) 10 mM, mercaptoéthanol 10 mM et  $\text{CaCl}_2$  50 mM, additionné ou non de l'un ou l'autre des composés suivants:—Détergents non ioniques (0,5%): Tween 80, Triton X100 ou Cemulsol NPT 10 (nonyl-phenol-plyoxyéthylène).—Polymères: Polyclar AT (2%), Polyvinylpyrrolidone PM 40 000 (2%) ou Carbowax 4000 (4%). L'extraction en vue de la purification est conduite de la façon suivante: 120 g de pulpe

<sup>20</sup> R. SHRINKE et N. MUGIBAYASHI, *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1381 (1971).

<sup>21</sup> D. R. DILLEY, *Plant Physiol.* **41**, 214 (1966).

<sup>22</sup> W. N. ARNOLD, *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 134 (1965).

<sup>23</sup> K. H. TIPPLES et R. TKACHUK, *Cereal Chem.* **42**, 111 (1965).

<sup>24</sup> M. S. BUTTROSE, *Austral. J. Biol. Sci.* **22**, 1297 (1969).

<sup>25</sup> P. BERNFELD, dans *Methods in Enzymology*, Vol. 1, p. 149, Academic Press, New York (1955).

<sup>26</sup> J. C. PECH, Thèse Docteur-Ingénieur. Toulouse (1970).

<sup>27</sup> M. J. JOHNSON, dans *Manometric Techniques*, p. 274, Burgess, Minneapolis (1957).

<sup>28</sup> T. SWAIN et H. E. HILLIS, *J. Sci. Food. Agric.* **10**, 63 (1959).

<sup>29</sup> J. L. GOLDSTEIN et T. SWAIN, *Phytochem.* **2**, 371 (1963).

<sup>30</sup> M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS et F. SMITH, *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).

<sup>31</sup> J. C. PECH, C. BARDET et J. FALLOT, *Compt. Rend.* **270**, 1171 (1970).

lyophilisée broyée sont soumis à une extraction à l'aide de 1200 ml de milieu contenant 0,5% de Cemulsoe NPT 10. Après infiltration sous vide, agitation assez vigoureuse pendant 30 min. et centrifugation à 38 000 g, l'extrait brut récupéré est de 950 ml (extrait I).

*2ème Etape—Filtration sur Sephadex G50.* L'extrait brut ainsi obtenu est soumis à une filtration sur une colonne de Sephadex G50 (90 × 9,5 cm) contenant environ 5000 cm<sup>3</sup> de gel préalablement équilibré avec du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,5. L'élution se fait avec le même tampon. A l'issue de ce traitement, la fraction active récupérée sur un collecteur de fractions a un volume de 1360 ml (extrait II).

*3ème Etape—Chromatographie sur DEAE Sephadex.* 1000 cm<sup>3</sup> de l'extrait précédemment obtenu sont mélangés avec 20 g de DEAE Sephadex A50 équilibré avec du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. L'ensemble est mis en agitation pendant une nuit. On dépose ensuite le gel de DEAE Sephadex sur une colonne et on lave avec 400 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. L'élution est effectuée grâce à un gradient de concentration linéaire en NaCl de 0 à 0,8 M dans le même tampon Tris-HCl 0,1 M (extrait III).

*4ème Etape—Concentration par dialyse sous pression; filtration sur Sephadex G100.* L'extrait obtenu après DEAE Sephadex est concentré environ 7 fois par dialyse sous pression (Système Amicon, membrane UM 10). La filtration sur une colonne de Sephadex G100 équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 du liquide ainsi concentré (30 ml) donne deux fractions E1 et E2 (extrait IV). La même opération effectuée sur un extrait brut ou après Sephadex G50 donne en plus une fraction E3 (Fig. 1). Celle-ci, dont l'activité est faible, n'est donc pas récupérée après passage sur DEAE Sephadex. C'est pourquoi, un quart du volume environ issu de Sephadex G50 (360 ml) est concentré 14 fois par ultrafiltration et soumis directement à une filtration sur Sephadex G100 (extrait V). La purification de la fraction E3 reste grande, en raison de la forte rétention de cette enzyme sur Sephadex G100 (Fig. 1). A la fin de ces opérations, on obtient donc 3 amylases E1, E2 et E3 dont le degré de purification est donné dans le tableau 2.

*Electrophorèse en gel de polyacrylamide.* La méthode de Davis<sup>32</sup> est utilisée pour la séparation des enzymes. La mise en évidence des amylases dans les gels est effectuée par la technique de Brewbaker *et al.*<sup>33</sup>

*Remerciements*—Les auteurs remercient Messieurs les Professeurs Zalta, Chimie Biologique, et Durand, Génie Biochimique, Toulouse, pour l'aide qu'ils ont apportée à ce travail et la Société Melle Bezons (Neuilly-sur-Seine, France) pour le don de détergents non ioniques du type Cemulsol.

<sup>32</sup> B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 405 (1964).

<sup>33</sup> J. L. BREWBAKER, M. D. UPADHYA, Y. MAKINEN et T. MACDONALD, *Physiol. Plantarum* **21**, 930 (1968).