

### 163. Recherches sur l'amidon VIII<sup>1)</sup>.

#### La dégradation des constituants de l'amidon par la $\beta$ -amylase

par Kurt H. Meyer, P. Bernfeld et J. Press.

(1. XI. 40.)

Les constatations que nous avons pu faire sur les différences de constitution des deux constituants de l'amidon — l'amylose et l'amylopectine — nous ont orientés vers l'étude du mécanisme et de la cinétique de leur dégradation enzymatique. Malgré le nombre très élevé de travaux consacrés à ces derniers problèmes, on manquait en effet jusqu'à présent de notions précises au sujet de la constitution du substratum; or, il est évident que cette lacune apportait une sérieuse entrave aussi bien à l'exécution des essais qu'à l'interprétation des résultats obtenus.

Le présent mémoire est consacré à la dégradation par la  $\beta$ -amylase, sujet où l'on possédait déjà les données suivantes.

Après que *Kuhn*<sup>2)</sup> eût constaté la diversité des amylases du pancréas et du malt et eût indiqué leur classement en amylases  $\alpha$  et  $\beta$ , *Ohlsson*<sup>3)</sup> montra dans un travail important que l' $\alpha$ -amylase (amylase du pancréas, amylase des glandes salivaires,  $\alpha$ -amylase du malt) scinde l'amidon en fragments relativement grands, tandis que la  $\beta$ -amylase (principal constituant de l'amylase du malt) forme immédiatement du maltose sans attaquer la molécule d'amidon à l'intérieur. La  $\beta$ -amylase s'attaque donc aux extrémités des chaînes d'amidon (*Ohlsson*<sup>3)</sup>, *Hanes*<sup>4)</sup>, *Samec*<sup>5)</sup>). Elle dégrade l'amylose intégralement, tandis que la dégradation de l'amylopectine s'arrête aux endroits de bifurcation, un corps résiduel de poids moléculaire élevé (dextrine résiduelle, érythrogranulose) restant encore à côté du maltose.

Toute une série de questions sont encore à résoudre, concernant entre autre le lieu de l'attaque, la cinétique de la dégradation, la coagulation dite enzymatique, etc.

Dans nos essais, nous avons utilisé généralement une  $\beta$ -amylase tirée de l'amylase du blé par inactivation à l'acide de l' $\alpha$ -amylase qu'elle contenait en faible proportion. Lorsque nous désirions nous adresser à un produit peu chargé de substances accessoires inactives et possédant une activité constante pendant un temps plus long,

<sup>1)</sup> II—VII, Helv. **23**, 845 (1940).

<sup>2)</sup> *R. Kuhn*, A. **443**, 1 (1925).

<sup>3)</sup> *E. Ohlsson*, Z. physiol. Ch. **189**, 17 (1930).

<sup>4)</sup> *C. S. Hanes*, New Phytologist **36**, 538 (1937).

<sup>5)</sup> *M. Samec*, Koll.-ch. Beih. **49**, 101 (1939).

nous avons recours de préférence à la préparation d'un enzyme sec purifié par fractionnement à l'alcool. Nos ferments étaient exempts d' $\alpha$ -amylase, aussi bien d'après le test indiqué par *Wijsman*<sup>1)</sup> que d'après leur manque d'action sur la dextrine résiduelle I (érythrogranulose<sup>2)</sup>) que l'enzyme  $\beta$  débarrassé d' $\alpha$ -amylase n'attaque pas.

L'activité de nos préparations exemptes d'amylase  $\alpha$  a été déterminée à l'aide d'une solution fraîche d'amidon (produit commercial selon *Zulkowsky*) de la manière décrite en détail plus bas; nous avons renoncé toutefois à indiquer cette activité au moyen d'unités conventionnelles telles que par exemple l'unité «amylase» de *Willstätter*<sup>3)</sup> ou l'unité Sf d'*Euler* et *Svanberg*<sup>4)</sup>, car l'adoption de ces unités est basée sur l'hypothèse d'une réaction monomoléculaire; or, comme nous allons le montrer plus bas, cette hypothèse n'est pas soutenable.

#### *Le lieu de la dégradation.*

La plupart des auteurs admettent que l'attaque enzymatique procède non pas du côté aldéhydique des chaînes, mais du côté des restes terminaux de glucose avec les hydroxyles libres 2, 3, 4, 6. Cette supposition est corroborée particulièrement nettement par des expériences de *Myrbäck*<sup>5)</sup> ainsi que de *Brown* et *Millar*<sup>6)</sup>. Il n'y aurait donc guère lieu de reprendre cette question si *Mayer*<sup>7)</sup> n'avait publié récemment des expériences desquelles il tire la conclusion que l'attaque a lieu du côté de l'extrémité aldéhydique des chaînes: de l'amidon ayant été traité par de petites quantités d'iode et dans lequel *Mayer* suppose les fonctions aldéhydiques bloquées par ce traitement, n'est en effet pas dégradé par la  $\beta$ -amylase. Les expériences de *Mayer* ne sont pas très convaincantes, car aux concentrations d'iode adoptées par lui, le  $p_H$  de ses solutions ne permet guère de songer à une oxydation de fonctions aldéhydiques. Il paraît bien plus plausible de penser à un empoisonnement du ferment par l'iode. C'est en effet ce qui se produit. Nous avons procédé à une oxydation incontestable des fonctions aldéhydiques; ensuite, nous avons éliminé l'iode et avons pu constater alors une dégradation normale après addition de  $\beta$ -amylase: les fonctions aldéhydiques libres ne jouent donc pas de rôle dans la dégradation par la  $\beta$ -amylase. Nous avons pu confirmer ainsi les résultats de *Myrbäck* et les opinions avancées par *Samec* et *Blinc*<sup>8)</sup>.

1) *H. P. Wijsman*, Thèse de doctorat, Amsterdam 1889.

2) *Helv.* **23**, 875 (1940).

3) *R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz et A. R. F. Hesse*, *Z. physiol. Ch.* **126**, 157 (1923).

4) *H. v. Euler et O. Svanberg*, *Z. physiol. Ch.* **112**, 193 (1921).

5) *K. Myrbäck*, *Bioch. Z.* **285**, 290 (1936).

6) *H. T. Brown et H. Millar*, *Soc.* **75**, 286 (1899).

7) *K. Mayer*, *Z. physiol. Ch.* **262**, 29 (1939).

8) *M. Samec et M. Blinc*, *Koll.-ch. Beih.* **49**, 101 (1939).

*L'action de la  $\beta$ -amylase sur l'amylose.*

a) *Le phénomène de la coagulation dite enzymatique.*

Dans un travail important, *Samec et Waldschmidt-Leitz*<sup>1)</sup> ont montré que le constituant le plus soluble de l'amidon, l'amylose, est entièrement dégradé en maltose par la  $\beta$ -amylase. Nous avons pu confirmer ce résultat; dans des essais comparés, nous avons trouvé que toutes les fois que le dosage des groupes terminaux dénote des ramifications des chaînes, la dégradation n'est pas intégrale et qu'alors la solution dégradée donne la réaction caractéristique rouge-violacée de la dextrine résiduelle<sup>2)</sup>.

Pour réaliser l'hydrolyse intégrale d'amylose pur non dégradé, il faut ajouter tout de suite à la solution diluée fraîche de l'amylose une grande quantité de ferment. En procédant autrement, on constate une scission incomplète et l'apparition d'un trouble, généralement même la séparation d'un précipité insoluble qu'on peut dissoudre par addition d'alcali et que la  $\beta$ -amylase peut dégrader après la neutralisation, ce qui prouve que ce précipité est constitué par de l'amylose. Cette précipitation d'amylose est désignée généralement par le terme de « coagulation enzymatique ». Pour expliquer ce phénomène un peu bizarre, nous pouvons nous reporter à d'anciennes indications de *Maquenne et Roux* ainsi qu'à nos observations sur le comportement de solutions d'amylose. Comme *Maquenne et Roux*<sup>3)</sup> l'ont constaté, de l'amylose séparé lentement de sa solution aqueuse n'est pas attaqué par l'amylase de malt. Nous avons trouvé nous-même que l'amylose brut est plus soluble que l'amylose de poids moléculaire plus élevé obtenu par fractionnement; les fractions de poids moléculaire faible ont l'effet de colloïdes protecteurs pour les solutions des fractions de poids moléculaire élevé. On a rencontré ce phénomène de l'accroissement de la solubilité de termes supérieurs d'une série par les termes inférieurs aussi chez des combinaisons de types tout à fait différents; citons comme exemple particulièrement frappant le cas de l'acide palmitique dont la solubilité dans le tétrachlorure de carbone passe du simple au double par l'addition de 1 % d'acide laurique (*Waentig et Peschek*<sup>4)</sup>). Pour expliquer la coagulation enzymatique, nous pouvons donc admettre que dans la solution sursaturée d'amylose mise en œuvre dans les essais avec les ferments, le ferment commence par faire disparaître des fractions de faible poids moléculaire qui servaient de colloïdes protecteurs des fractions de poids moléculaire élevé; si on leur en laisse le temps, ces dernières se séparent à l'état cristallin et échappent de cette manière à la dégra-

<sup>1)</sup> *M. Samec et E. Waldschmidt-Leitz*, Z. physiol. Ch. **203**, 16 (1931).

<sup>2)</sup> *Helv.* **23**, 865 (1940).

<sup>3)</sup> *L. Maquenne et E. Roux*, Ann. chim. [8] **9**, 179 (1906).

<sup>4)</sup> *P. Waentig et H. Peschek*, Z. physikal. Ch. **93**, 521 (1919).

dation enzymatique. Cette résistance à l'action de la  $\beta$ -amylase, due à l'agglomération en de gros paquets, peut se produire aussi dans des solutions vieilles avant même qu'elles contiennent un précipité, comme *Samec*<sup>1)</sup> l'a souligné récemment et comme nous l'avons constaté à notre tour; une solution fraîche d'amylose à 0,18 % présente après 15 minutes déjà une diminution nette de sa sensibilité vis-à-vis de l'amylase. (Essais N° 3 et 4.)

Si donc on lit parfois (cf. par exemple *R. Kuhn*<sup>2)</sup> ou *Hirst, Plant et Wilkinson*<sup>3)</sup> qu'un échantillon donné d'amylose n'est pas entièrement dégradé par la  $\beta$ -amylase, ce fait peut être dû à deux causes différentes: il peut s'agir d'un amylose non-exempt de constituants ramifiés, ce qui veut dire, d'après notre terminologie, qui contient de l'amylopectine. Il reste alors en solution une dextrine résiduelle se colorant en rouge à violet avec l'iode. D'autre part, l'amylose, même étant pur, peut être réfractaire à l'action de l'enzyme, par suite d'un phénomène d'aggrégation (vieillessement), ou devenir réfractaire durant l'action enzymatique; dans ce cas, on obtient une coloration bleu-pur avec l'iode.

#### b) *La cinétique de la dégradation amylolique.*

Plusieurs auteurs ont observé que la quantité de maltose mis en liberté par unité de temps par la  $\beta$ -amylase reste constante jusqu'à la dégradation d'environ 40 % du substratum (cf. *Samec et Blinc*<sup>4)</sup>). La courbe figurant les quantités de maltose formées en fonction du temps est une droite: la réaction est d'ordre zéro. Nous n'avons pu trouver que des indications qualitatives à ce sujet; en outre, ces indications se rapportaient à des produits dont la définition laisse à désirer. Nous avons alors entrepris des essais avec plusieurs échantillons d'amylose et nous avons obtenu des courbes rectilignes de ce genre jusqu'à une dégradation de 65 %, à la condition de travailler de telle sorte que le vieillissement rappelé plus haut ne pût gêner (essai N° 6, fig. 1). Ces courbes rectilignes s'expliquent par la conformation de la molécule d'amylose et par le caractère de la dégradation enzymatique: si un reste de maltose est éliminé à l'extrémité d'une chaîne, il se produit au moment de la scission un nouveau groupe terminal identique au précédent si bien que la concentration des groupes terminaux est aussi constante que celle de l'enzyme. Ce n'est que lorsque la dégradation a abouti à l'hydrolyse complète de certaines chaînes que le nombre des groupes terminaux commence à diminuer, ce qui entraîne une diminution de la vitesse de la réaction.

<sup>1)</sup> *M. Samec, Z. physiol. Ch.* **263**, 17 (1940).

<sup>2)</sup> *R. Kuhn, A.* **443**, 31 (1925).

<sup>3)</sup> *E. L. Hirst, M. T. Plant et M. D. Wilkinson, Soc.* **1932**, 2379.

<sup>4)</sup> *M. Samec et M. Blinc, Koll.-ch. Beih.* **49**, 150 (1939).

*Action de l'enzyme sur l'amylopectine et l'amidon dégradé.*

La dégradation de l'amylopectine par la  $\beta$ -amylase n'est pas intégrale. Il se forme toujours un corps résiduel de poids moléculaire élevé, puisque l'enzyme est arrêté dans son action aux points de bifurcation. Les solutions sursaturées d'amylopectine précipitent assez rapidement de sorte que cette substance ne se prête pas bien à l'étude de la cinétique de la dégradation par la  $\beta$ -amylase. Un substratum plus approprié est fourni par de l'amidon dégradé, par ex. de l'amidon selon *Zulkowsky* dont on connaît la préparation par dégradation dans de la glycérine et qui contient 90 % d'amylopectine dégradée.

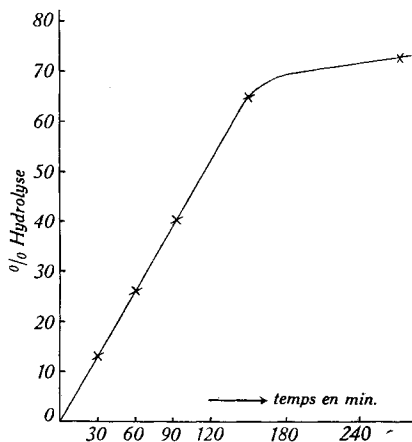


Fig. 1.

Dégradation de l'amylose par la  $\beta$ -amylase. (Essai N° 6.)

L'emploi d'amidons dégradés convenables a l'avantage de supprimer les phénomènes de vieillissement; il est cependant indiqué de constater l'absence de l'influence du vieillissement dans chaque échantillon, en comparant entre elles des solutions fraîches et vieilles; en effet, on rencontre des produits d'« amidon soluble » chez lesquels des effets de vieillissement se manifestent. Au lieu d'utiliser une solution fraîche, on peut aussi alcaliniser une solution vieille et ensuite neutraliser. Car dans une solution alcaline, les associations sont désagrégées. Ce traitement a pour effet de « rajeunir » la solution. Dans le cas de l'amidon soluble, la réaction n'est d'ordre zéro que jusqu'à 30—40 % de dégradation; ensuite la vitesse diminue rapidement. L'enzyme procède par dégradation à partir des extrémités de chaînes; la diminution de la vitesse de réaction signifie sans doute que le nombre des groupes terminaux réactifs diminue, ce qui sera le cas lorsque dans le substratum, les chaînes sont de longueurs variables: dans les ramifications relativement courtes, l'enzyme rencontre bientôt l'obstacle d'une bifurcation si bien que ces rameaux ne prennent

plus part à la réaction. La diminution du nombre de groupes capables d'entrer en réaction explique le ralentissement de la dégradation.

*Dégradations comparées de l'amylose et de l'amylopectine.*

En liaison avec nos constatations au sujet des différences de constitution des deux composants de l'amidon, une observation faite par divers auteurs (p. ex. *Freemans* et *Hopkins*<sup>1)</sup> ou *Samec*<sup>2)</sup>) nous a paru intéressante; il s'agit du fait que toutes choses étant égales d'ailleurs, l'amylose est dégradé plus lentement que l'amidon. Pour savoir s'il s'agit d'un phénomène de vieillissement ou d'un effet de la différence de constitution, nous avons procédé à des essais comparés avec des solutions fraîches d'amylose et d'amidon soluble. Les concentrations respectives d'enzyme et de substratum étaient les mêmes, de manière à fournir des résultats vraiment comparables (Essais 1 et 3, Fig. 2.) En confirmation de résultats déjà obtenus

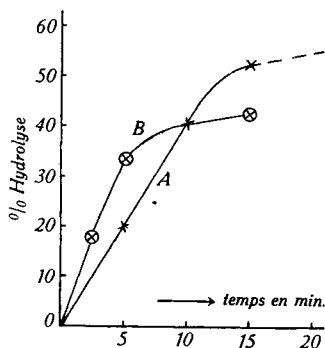


Fig. 2.

Dégradation comparative de l'amylose (courbe A) et de l'amidon soluble (courbe B) par la  $\beta$ -amylase. (Essais Nos 1 et 3.)

avec de l'amylose brut, nous avons constaté que des solutions fraîches, non-vieillies, d'amylose pur sont également dégradées plus lentement que les solutions d'amidon soluble formé essentiellement d'amylopectine dégradée. Cela s'explique par le fait que, soit l'amylopectine, soit l'amidon dégradé possèdent un plus grand nombre de groupes terminaux que l'amylose: à concentrations identiques en poids, l'amidon offre à l'enzyme un nombre plus grand de points d'attaque que l'amylose; en d'autres termes, le remplacement de l'amylose par son poids d'amylopectine revient à une augmentation de la concentration du substratum. Des essais comparés de ce genre devraient dès lors permettre de déterminer la teneur en groupes terminaux de polysaccharides du type de l'amidon. Il est vrai que cette détermination exigerait au préalable la connaissance de la

<sup>1)</sup> G. G. *Freemans* et R. H. *Hopkins*, *Biochem. J.* **30**, 446 (1936).

<sup>2)</sup> M. *Samec* et M. *Blinc*, *Koll.-ch. Beih.* **49**, 150 (1939).

relation entre vitesse de réaction et concentration de substratum et d'enzyme, avec plus de précision que ne l'offrent les conclusions qu'on peut tirer des observations faites jusqu'à présent généralement avec des mélanges d'enzymes (amylase du malt). Nous avons entrepris des essais systématiques dans cette direction.

### Partie expérimentale.

#### *Examen de la $\beta$ -amylase.*

##### a) *Détermination d'activité.*

On dose l'humidité de l'amidon du commerce (*Schering-Kahlbaum*) selon *Zulkowsky* par dessiccation dans le vide à 80°. Une quantité d'amidon correspondant à 1 gr.  $C_6H_{12}O_6$  est dissoute dans de l'eau; on ajoute 1 cm<sup>3</sup> de tampon à l'acétate (10,2 cm<sup>3</sup> d'acide acétique glacial et 30,7 gr. d'acétate de sodium cristallisé au 250 cm<sup>3</sup> d'eau;  $p_H = 4,8$ ) et porte à 100 cm<sup>3</sup>. 25 cm<sup>3</sup> de la solution fraîche d'amidon sont additionnés exactement à 35,0° dans un erlenmeyer (200 cm<sup>3</sup>) de 1 cm<sup>3</sup> de la solution d'enzyme portée également à 35°. Après 10 minutes exactement, on dose le maltose formé d'après *Bertrand*, en arrêtant à cet effet l'action de l'enzyme par addition de liqueur de *Fehling*. Le pouvoir réducteur initial de la solution d'amidon est déterminé dans un essai à blanc. La concentration de la solution de l'enzyme doit être choisie telle que l'hydrolyse ne dépasse pas 20%.

##### b) *Recherche de l' $\alpha$ -amylase selon Wijsman<sup>1)</sup>.*

On prépare une solution de 8 gr. de gélatine et de 0,5 gr. d'amidon selon *Zulkowsky* dans 99 cm<sup>3</sup> d'eau et 1 cm<sup>3</sup> de tampon à l'acétate du  $p_H$  4,8; on la laisse se prendre dans des vases *Pétri*. Sur la plaque de gélatine solidifiée, on dépose plusieurs gouttes de la solution enzymatique à examiner et laisse reposer huit jours à environ 0° dans une atmosphère de chloroforme. Ensuite, on verse sur le tout une solution d'iode 0,02-n. dans de l'iodure de potassium; après 30 secondes, on rince la gélatine à l'eau distillée. En absence d' $\alpha$ -amylase, on voit sur un fond bleu foncé un champ homogène rose-violacé clair. La présence d' $\alpha$ -amylase se traduit par l'apparition, à l'intérieur de ce champ rose-violacé, d'un champ concentrique incolore.

##### c) *Recherche de l'absence de l' $\alpha$ -amylase à l'aide de dextrine résiduelle.*

1 gr. de dextrine résiduelle I est dissout dans peu d'eau, on ajoute 1 cm<sup>3</sup> de tampon à l'acétate et une quantité de solution d'amylase contenant environ le centuple de la quantité d'enzyme nécessaire pour mettre en liberté environ 50 mgr. d'hydrate de maltose en

<sup>1)</sup> Thèse de doctorat de *H. P. Wijsman*, Description du procédé par *G. A. von Klinkenberg*, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. of Sect. Sci. **34**, 893 (1931).

10 minutes à partir de 25 cm<sup>3</sup> d'une solution d'amidon selon *Zulkowsky* à 1%, au p<sub>H</sub> 4,8 et à 35°. Le volume est porté à 100 cm<sup>3</sup>. L'enzyme peut être considéré comme exempt d' $\alpha$ -amylase si la quantité de maltose formé ne dépasse pas 10% de l'hydrate de carbone mis en œuvre, après 100 heures d'action à 35°.

### *Préparation de la $\beta$ -amylase.*

a) *Extraction de l'enzyme brut de la farine de blé.*

Une partie de farine de blé fraîchement moulue est agitée avec 7 parties d'eau à la température ordinaire; la formation de grumeaux doit être évitée. La suspension pâteuse est centrifugée 10 minutes à 3000 tours à la minute; la solution claire surnageante est versée sur un filtre à plis.

*Détermination de l'activité selon a):* 1 cm<sup>3</sup> est additionné de 6,5 cm<sup>3</sup> d'eau; 1 cm<sup>3</sup> de cette dilution a donné 29,0 mgr. de maltose hydraté. La réaction de *Wijsman* a donné un champ central incolore nettement visible; la solution enzymatique contenait donc de l' $\alpha$ -amylase.

b) *Destruction de l' $\alpha$ -amylase selon Blom, Bak et Braae*<sup>1)</sup>.

4 volumes de l'extrait brut refroidi à 0° sont mélangés à 1 volume d'acide acétique normal de 0°. On laisse reposer quatre jours à 0°. On ajoute alors 1 volume d'une solution normale d'acétate de sodium, ce qui porte le p<sub>H</sub> de la solution à 4,8; on filtre sur un filtre à plis et obtient une solution tout à fait limpide, légèrement jaunâtre, qui peut être conservée plusieurs semaines à 0°, en présence de quelques gouttes de toluène. Des solutions de ce type nous ont servi pour les essais quantitatifs.

*Activité:* 1 cm<sup>3</sup> de solution est additionné de 4 cm<sup>3</sup> d'eau (cette dilution correspond à celle obtenue en diluant l'extrait brut par addition de 6,5 cm<sup>3</sup> d'eau à 1 cm<sup>3</sup> d'extrait), 1 cm<sup>3</sup> de cette dilution met en liberté 19,9 mgr. de maltose hydraté.

La réaction de *Wijsman* donne un champ rose-violacé tout à fait homogène (absence d' $\alpha$ -amylase).

Pour obtenir une solution plus concentrée, 1600 cm<sup>3</sup> de la solution ci-dessus ont été concentrés à 35° sous 12 mm de pression à 200 cm<sup>2</sup>.

*Activité:* 1 cm<sup>3</sup> est additionné de 39 cm<sup>3</sup> d'eau; 1 cm<sup>3</sup> de cette dilution a donné 15,9 mgr. de maltose hydraté. La concentration de la solution au huitième de son volume a donc entraîné une perte d'activité de 20%.

*Réaction à la dextrine résiduelle:* 7,5 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique concentrée ont provoqué dans la solution à 1% de 1 gr. de dextrine résiduelle la formation de 63 mgr. de maltose après 100 heures (6,3% de dégradation).

c) *Précipitation fractionnée de l'enzyme brut.*

14 litres d'extrait brut de farine de blé ont été concentrés sous 12 mm de pression à 35° à environ 1 litre. On a ajouté alors de l'alcool de 95% jusqu'à ce que sa concentration dans la liqueur ait atteint 50%, et centrifugé le précipité formé. La solution limpide est alors additionnée d'alcool jusqu'à une concentration de 80%, le précipité est centrifugé, trituré deux fois avec de l'alcool à 95%, de nouveau centrifugé et séché dans le vide sur du chlorure de calcium: 18 gr. de produit brut dans lequel la réaction de *Wijsman* décèle encore la présence de quantités perceptibles d' $\alpha$ -amylase.

*Activité:* 1 cm<sup>3</sup> de la solution à 0,1% a donné 51,8 mgr. de maltose hydraté.

Le précipité obtenu avec 50% d'alcool est insoluble dans l'eau. Une nouvelle addition d'alcool à la liqueur-mère à 80% d'alcool ne précipite presque plus rien.

Le produit brut a été repris dans 650 cm<sup>3</sup> d'eau; on centrifuge du faible résidu insoluble qui apparaît. La solution limpide est additionnée d'alcool à 95% jusqu'à une

<sup>1)</sup> *J. Blom, A. Bak et B. Braae, Z. physiol. Ch.* **241**, 273 (1936).



teneur en alcool de 50%, le précipité formé est centrifugé: fraction 1. La solution surnageante, limpide, est portée à une teneur en alcool de 60% et centrifugée: fraction 2. A 66% d'alcool on obtient la fraction 3, à 73% la fraction 4 et à 80% la fraction 5. Les cinq fractions obtenues ont été triturées séparément avec de l'alcool, ce qui transformait ces produits collants en flocons. L'alcool a été centrifugé; cette opération a été répétée une fois avec de l'alcool, puis deux fois avec de l'éther; le produit a été séché ensuite à l'air.

Les déterminations d'activité des cinq fractions ont été faites chaque fois avec 1 cm<sup>3</sup> d'une solution à 0,1%.

| Fraction | Rendement | Activité mgr. de maltose hydr. | Solubilité dans l'eau | Réaction de <i>Wijsman</i>       |
|----------|-----------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 1        | 2 gr.     | 20,5                           | faible résidu         | contient de l' $\alpha$ -amylase |
| 2        | 2 gr.     | 39,3                           | sol. trouble          | contient de l' $\alpha$ -amylase |
| 3        | 3 gr.     | 136,5                          | facil. soluble        | exempt d' $\alpha$ -amylase      |
| 4        | 5 gr.     | 17,4                           | très soluble          | exempt d' $\alpha$ -amylase      |
| 5        | 1 gr.     | 4,8                            | très soluble          | exempt d' $\alpha$ -amylase      |

La fraction 3, la plus active et exempte d' $\alpha$ -amylase, a été fractionnée encore une fois par précipitation de sa solution aqueuse par addition d'alcool; cette fois, la fraction la plus active a été obtenue à 60% d'alcool; son activité était à peu près le double de celle de la fraction 3 (1 cm<sup>3</sup> d'une solution à 0,02% a donné 47 mgr. de maltose hydraté).

Examen à la dextrine résiduelle: 20 mgr. d'enzyme ont donné à partir d'un gr. de dextrine après 100 heures 67 mgr. de maltose hydraté, ce qui représente une dégradation de 6,7%. La préparation est donc exempte d' $\alpha$ -amylase.

*Action de la  $\beta$ -amylase sur l'amidon après oxydation de ses fonctions aldéhydiques.*

Une prise de 25 cm<sup>3</sup> d'un empois d'amidon de maïs à environ 3% préparé à 100° est additionnée de 2 cm<sup>3</sup> de soude caustique 2-n., puis de 9 cm<sup>3</sup> d'iode 0,01-n. Après 30 minutes, on neutralise par addition de 4 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique n.; l'iode mis en liberté est réduit par addition de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 0,01-n. (consommé 8,75 cm<sup>3</sup>). On ajoute alors 0,5 cm<sup>3</sup> de tampon à l'acétate et porte à 50 cm<sup>3</sup>; 10 cm<sup>3</sup> de cette solution ont été soumis durant 24 heures à l'action de 1 cm<sup>3</sup> d'une solution d'amylase (activité: 0,2 cm<sup>3</sup> donnent 21 mgr. de maltose hydraté), à 35%. Un essai à blanc est effectué avec de l'empois non traité, dilué par addition de son volume d'eau. Le maltose a été dosé d'après *Bertrand*, en tenant compte du faible pouvoir réducteur de l'enzyme à blanc. La solution consomme 17,6 cm<sup>3</sup> de permanganate de potassium, ce qui correspond à 103 mgr. de maltose hydraté; la solution de l'essai à blanc 17,2 cm<sup>3</sup> ce qui correspond à 101 mgr. de maltose hydraté. La destruction des fonctions aldéhydiques par oxydation ne modifie donc pas l'allure de la réaction avec la  $\beta$ -amylase.

25 cm<sup>3</sup> d'empois d'amidon à 3% consomment 0,25 cm<sup>3</sup> d'iode 0,01-n.; si l'iode consommé a servi à oxyder des fonctions aldé-

hydriques, et s'il y a une fonction aldéhydique par molécule, cette oxydabilité correspond à un poids moléculaire de l'ordre de quelques centaines de mille.

*Vieillessement de l'amidon soluble et de l'amylose.*

40 cm<sup>3</sup> d'une solution à 1/2 % d'amidon soluble, vieille de 15 jours, a été additionnée de 10 cm<sup>3</sup> NaOH 2-n., puis de 40 cm<sup>3</sup> d'acide acétique n. ce qui porte son p<sub>H</sub> à 4,8; on a ajouté ensuite 2,25 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique (activité: 0,2 cm<sup>3</sup> donnent 19 mgr. de maltose hydraté) et porté le volume de la solution immédiatement à 100 cm<sup>3</sup> par addition d'eau. Dans 10 cm<sup>3</sup> de cette solution diluée, on a dosé l'amidon par hydrolyse acide et titrage selon *Bertrand*.

Dans la dernière colonne des tableaux suivants, on trouve la grandeur

$$K = \frac{x}{a \cdot b \cdot t}$$

où *a* signifie la concentration en hydrate de carbone (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)<sub>n</sub> en gr./100 cm<sup>3</sup>, *b* celle de l'enzyme en cm<sup>3</sup> de solution d'enzyme/100 cm<sup>3</sup>, *t* le temps et *x* la quantité de maltose hydraté (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>) formé en gr./100 cm<sup>3</sup>.

**Essai N° 1.**

Solution «rajeunie».

Conc. de l'amidon: 0,188 gr./100 cm<sup>3</sup>; conc. de l'enzyme: 2,25 cm<sup>3</sup>/100 cm<sup>3</sup>.

| Temps min. | Maltose hydr. gr./100 cm <sup>3</sup> | Hydrolyse % | K     |
|------------|---------------------------------------|-------------|-------|
| 2,5        | 0,033                                 | 17,5        | 0,031 |
| 5          | 0,062                                 | 33,0        | 0,029 |
| 10         | 0,075                                 | 40,0        | 0,018 |
| 15         | 0,080                                 | 42,5        | 0,013 |
| 30         | 0,084                                 | 44,5        | 0,007 |

Dans l'essai comparatif, la solution vieille a été additionnée de tampon à l'acétate et de la même quantité de solution d'enzyme que dans l'essai précédent. Les écarts des observations rentrent dans les limites d'erreur.

**Essai N° 2.**

Essai comparatif avec une solution d'amidon vieillie.

| Temps min. | Maltose hydr. gr./100 cm <sup>3</sup> | Hydrolyse % | K     |
|------------|---------------------------------------|-------------|-------|
| 5          | 0,057                                 | 30          | 0,027 |

0,2 gr. d'amylose brut cristallisé dans de l'eau<sup>1)</sup> ont été dissous dans 10 cm<sup>3</sup> NaOH 2-n., la solution a été chauffée à 35°, additionnée de 40 cm<sup>3</sup> d'eau et de 40 cm<sup>3</sup> d'acide acétique n., puis de 2,25 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique (activité, cf. plus haut) et portée à 100 cm<sup>3</sup>. La concentration de l'amylose a été dosée sur une prise par hydrolyse acide.

<sup>1)</sup> Helv. **23**, 860 (1940).

**Essai N° 3.**

Conc. de l'amylose: 0,176 gr./100 cm<sup>3</sup>; conc. de l'enzyme: 2,25 cm<sup>3</sup>/100 cm<sup>3</sup>.

| Temps<br>min. | Maltose hydr.<br>gr./100 cm <sup>3</sup> | Hydrolyse<br>% | K     |
|---------------|--|----------------|-------|
| 5             | 0,036                                    | 20,5           | 0,018 |
| 10            | 0,072                                    | 41,0           | 0,018 |
| 15            | 0,093                                    | 52,5           | 0,016 |
| 30            | 0,103                                    | 58,0           | 0,009 |

A titre de comparaison, on a fait un essai avec une solution de même préparation, mais en n'introduisant l'enzyme que 15 minutes après la neutralisation.

**Essai N° 4.**

Conc. de l'amylose: 0,180 gr./100 cm<sup>3</sup>; conc. de l'enzyme: 2,25 cm<sup>3</sup>/100 cm<sup>3</sup>.

| Temps<br>min. | Maltose hydr.<br>gr./100 cm <sup>3</sup> | Hydrolyse<br>% | K      |
|---------------|--|----------------|--------|
| 2,5           | 0,015                                    | 8              | 0,0145 |
| 5             | 0,030                                    | 16             | 0,0145 |
| 10            | 0,060                                    | 32             | 0,0145 |
| 30            | 0,086                                    | 48             | 0,0071 |

La vitesse de dégradation est diminuée de 20%.

*Dégradation complète et incomplète de l'amylose par la β-amylose (vieillessement).*

Environ 500 mgr. d'amylose cristallisé dans de l'eau ont été dissous dans 25 cm<sup>3</sup> NaOH n., additionnés de 250 cm<sup>3</sup> d'eau, portés au p<sub>H</sub> 4,3 par addition de 50 cm<sup>3</sup> d'acide acétique n. et chauffés à 35°. Des prises de 65 cm<sup>3</sup> de cette solution ont été additionnées chaque fois de 10 cm<sup>3</sup> de solutions d'enzyme sec (2 fois fractionné, activité: 1 cm<sup>3</sup> d'une solution à 0,02% donne 47 mgr. de maltose hydraté) de teneurs variables; après 24 heures d'action du ferment, on a titré le maltose selon *Bertrand*.

**Essai N° 5.**

| Amylose<br>mgr./10 cm <sup>3</sup> | Enzyme<br>mgr./10 cm <sup>3</sup> | Maltose hydr.<br>mgr./10 cm <sup>3</sup> | Hydrolyse<br>% | Color.<br>avec l'iode | Aspect<br>de la sol. |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|----------------|-----------------------|----------------------|
| 12,5                               | 5                                 | 12,5                                     | 100            | —                     | limpide              |
| 12,5                               | 2,5                               | 12,6                                     | 101            | —                     | limpide              |
| 12,5                               | 1                                 | 12,5                                     | 100            | —                     | limpide              |
| 12,5                               | 0,5                               | 11,9                                     | 95             | bleu pâle             | trouble              |
| 12,5                               | 0,1                               | 8,5                                      | 68             | bleu int.             | amylose ppté         |

*Préparation d'amylose facilement soluble par dégradation à l'aide d' $\alpha$ -amylase.*

200 gr. d'amidon de maïs naturel ont été agités une heure à 70° dans 10 litres d'eau; après 3 heures de repos, on a filtré le liquide surnageant sur un filtre à plis. On a obtenu 7 litres d'une solution d'amylose limpide, du  $p_H$  5,3. Sans ajouter de tampon, cette liqueur a été additionnée à la température ordinaire de 50 cm<sup>3</sup> d'une solution d' $\alpha$ -amylase; celle-ci était constituée par un extrait de malt aqueux, porté 20 minutes à 70° et filtré ensuite. Après 15 minutes, la coloration à l'iode avait passé au rouge-pourpre. On arrête alors la dégradation par addition de 7 cm<sup>3</sup> HCl n. Après 16 heures de repos, on a neutralisé la solution par addition de 3,5 cm<sup>3</sup> NaOH 2-n. ( $p_H$  alors = 6,8). Pour détruire à coup sûr toute trace d'amylase, la solution a été portée 15 minutes à 95°. Ensuite, elle a été concentrée sous 12 mm de pression à 35° à 340 cm<sup>3</sup>, filtrée et précipitée par 1500 cm<sup>3</sup> d'alcool à 90 %. On laisse le précipité d'amylose se déposer, on siphonne la solution claire surnageante, lave le résidu plusieurs fois à l'alcool puis à l'éther et sèche à l'air: rendement 3,5 gr. d'un produit facilement soluble dans l'eau et coloré en rouge-brun par l'iode.

*Hydrolyse de l'amylose dégradé en présence de  $\beta$ -amylase.*

1,35 gr. de cet amylose sont dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau; la solution filtrée est additionnée de 2,5 cm<sup>3</sup> de tampon à l'acétate et portée à 250 cm<sup>3</sup> par addition d'eau. 100 cm<sup>3</sup> de la solution diluée sont additionnés de 0,20 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique (activité: 0,2 cm<sup>3</sup> donnent 21 mgr. de maltose hydraté); le maltose est dosé selon *Bertrand*.

**Essai N° 6.**

Concentration de l'amylose: 0,515 gr./100 cm<sup>3</sup>.

| Temps<br>min. | Maltose hydr.<br>gr./100 cm <sup>3</sup> | Hydrolyse<br>% | K     |
|---------------|--|----------------|-------|
| 30            | 0,067                                    | 13,1           | 0,022 |
| 60            | 0,134                                    | 25,9           | 0,022 |
| 90            | 0,209                                    | 40,5           | 0,022 |
| 150           | 0,334                                    | 64,7           | 0,022 |
| 270           | 0,374                                    | 72,5           | 0,013 |
| 330           | 0,376                                    | 72,9           | 0,011 |
| 390           | 0,378                                    | 73,2           | 0,009 |

Genève, Laboratoire de Chimie inorganique  
et organique de l'Université.