

87. Sur la structure fine du grain d'amidon.

Recherches sur l'amidon 53¹⁾

par Kurt H. Meyer† et Robert Menzi²⁾.

(14 III 53)

Alors que l'isolement, la constitution et les propriétés des deux polysaccharides constituant le grain d'amidon ont fait l'objet d'un nombre énorme de travaux, l'étude de la structure fine du grain lui-même n'a été qu'à peine effleurée. Aussi nous sommes-nous proposés de l'effectuer en vouant une attention particulière aux régions dites « cristallines » du grain.

L'amidon est formé à l'intérieur des plastes chlorophylliens où il apparaît sous forme de grains incolores et réfringents. Très petits dans les chloroplastes où ils n'existent que transitoirement, ces grains deviennent au contraire assez volumineux dans les organes de réserve (rhizomes, tubercules, graines, etc.) où ils apparaissent sous des formes bien définies, caractéristiques des espèces.

Dans un travail aujourd'hui classique, *A. Meyer*³⁾ a montré que chaque grain était formé de couches concentriques, plus ou moins apparentes autour d'un point initial appelé hile. Ces stries d'autant plus espacées qu'elles sont plus périphériques, seraient formées de cristallites allongés dont l'existence est confirmée par la biréfringence du grain. En effet, au microscope polarisant il présente toujours 2 bandes obscures, entrecroisées au niveau du hile (phénomène de la croix noire) et correspondant aux plans de polarisation des nicols. Le grain d'amidon se comporte donc optiquement comme un sphéro-cristal, c'est-à-dire comme un agrégat de cristaux en aiguilles, arrangés radialement.

La nature cristallisée du grain a été confirmée au moyen des rayons X. Selon l'origine de l'amidon examiné, plusieurs types de diagrammes ont été obtenus par *Katz* et coll.⁴⁾, qui montrèrent de plus qu'une molécule d'eau devait être associée à chaque unité de glucose pour que puisse exister le réseau cristallin.

Le grain d'amidon n'est cependant pas un sphérolite ordinaire car il peut se déformer élastiquement. *K. H. Meyer* et coll.⁵⁾ ont attribué ce phénomène à l'association de quelques segments de diverses chaînes donnant naissance à des cristallites, les autres segments restant libres ou s'incorporant à des cristallites voisins. L'amidon se comporterait donc comme les autres polymères caténiformes (gélatine, cellulose, caoutchouc) en formant des « frange micel » selon la théorie de *Gerngross*, *Hermann & Abitz*⁶⁾.

Différents auteurs ont examiné l'action de la chaleur sur les grains d'amidon secs. Elle peut entraîner la scission des chaînes glucosidiques avec formation de nouveaux points de ramification, ce qui modifie les spectres aux rayons X des grains et les rend partiellement solubles dans l'eau froide. Par contre, lorsqu'on chauffe des grains en suspension aqueuse, ils gonflent jusqu'à atteindre 100 fois leur volume primitif (waxy maize, amidon de pommes de terre). Le gonflement est atténué par adjonction d'électrolytes qui agissent

1) Recherches sur l'amidon 52, *Helv.* **36**, 197 (1953).

2) Adresse actuelle: Battelle Memorial Institute, International Division, Genève.

3) *A. Meyer*, Untersuchungen über die Stärkekörner; Fischer, Jena 1895.

4) *J. R. Katz & J. C. Derksen*, *Z. physikal. Ch. (A)* **150**, 100 (1930); *J. R. Katz & Th. B. v. Itallie*, *Z. physikal. Ch. (A)* **155**, 199 (1931); **166**, 27 (1933).

5) *K. H. Meyer & P. Bernfeld*, *Helv.* **23**, 890 (1940).

6) *O. Gerngross, K. Hermann & W. Abitz*, *Bioch. Z.* **228**, 430 (1930).

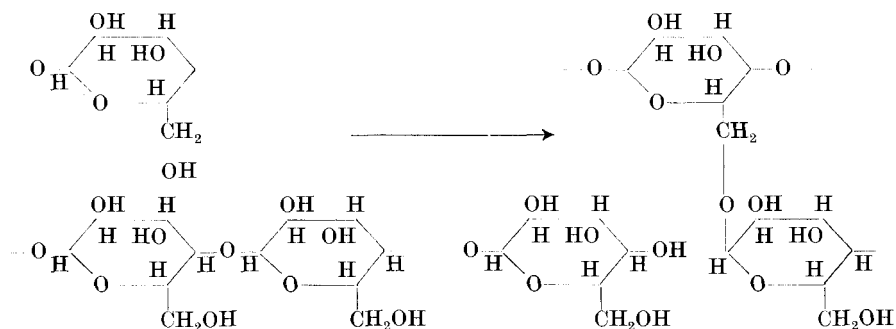
conformément à la théorie osmotique ou encore, selon certains auteurs¹⁾, en modifiant la charge électrostatique du produit (ester phosphorique de l'amylopectine par exemple²⁾.

Enfin, *K. H. Meyer* a montré¹⁾ que tous les solvants capables de rompre les liaisons hydrogène favorisaient le gonflement.

Le traitement à l'eau chaude provoque la dissolution des petits cristaux et la diffusion hors des grains, de l'amylose à bas poids moléculaire. Le grain acquiert ainsi une structure de plus en plus lâche et finit par se désagréger lorsque, par un chauffage plus poussé, tous les cristallites disparaissent.

Deux problèmes ont été abordés au cours de cette étude: d'un côté l'influence de la chaleur sur l'état de cristallisation des grains d'amidon ainsi que l'effet de cette cristallisation sur leur gonflement, et de l'autre la nature des polyholosides formant les cristallites et la membrane périphérique du grain.

Effets de la chaleur. Lorsque l'on chauffe les grains d'amidon au-dessus de 100°, on obtient des produits solubles à froid: ce sont les «dextrines», «British gums», etc. Selon la température à laquelle se fait cette opération, le grain est plus ou moins désagrégé. Au delà d'une certaine température qui varie avec l'origine de l'amidon (170° pour l'amidon de pommes de terre), le grain devient entièrement soluble, ce qui résulte d'une véritable transformation des molécules polyholosidiques. En effet, les chaînes glucosidiques se rompent et créent de nouvelles ramifications suivant la réaction³⁾:



Simultanément, la proportion de matières solubles augmente.

Nous avons admis que parallèlement à ce phénomène, une cristallisation plus complète devait se produire, se traduisant par une diminution de la faculté de gonflement des grains.

Des échantillons d'amidon séchés à l'air ont été chauffés à 150° (température à laquelle la dextrinisation est peu importante) durant des laps de temps croissants. Ensuite, le gonflement des grains par immersion dans de l'eau chaude a été déterminé arbitrairement, de même que la quantité d'amidon passant en solution pendant cette

¹⁾ *K. H. Meyer & M. Fuld*, *Helv.* **25**, 391 (1942).

²⁾ *G. C. Nutting*, *J. Coll. sci.* **7**, 128 (1952).

³⁾ *B. Brimhall*, *Ind. Eng. Chem.* **36**, 73 (1944).

dernière opération. On constate que la teneur en fractions solubles augmente au cours du temps alors que le gonflement diminue, compte tenu de la quantité d'amidon solubilisé. Ces faits doivent être attribués à la croissance des petits cristallites au profit des segments moléculaires libres dont dépend le gonflement (voir courbe no. 1).

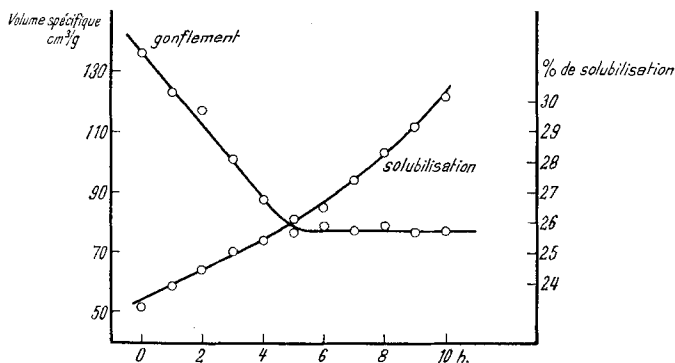


Fig. 1.

Durée de chauffage à 150°, en h.

Nature du polyholoside formant les cristallites. D'après Kerr¹⁾, la majeure partie des régions cristallines de l'amidon serait constituée par de l'amylose qui seule présenterait des chaînes suffisamment longues pour former des cristallites.

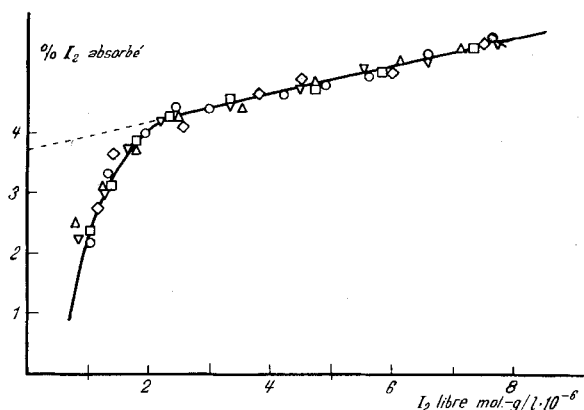
Pour vérifier cette assertion, nous avons soumis des grains à des hydrolyses ménagées, dans l'idée que les régions cristallines résisteraient davantage que les amorphes, par analogie avec le comportement de la cellulose. Une analyse des produits obtenus après fractionnement devrait alors permettre de déterminer lequel des deux polyholosides, de l'amylose ou de l'amylopectine, a été le plus dégradé.

Nous avons fait agir de l'acide chlorhydrique à diverses concentrations sur de l'amidon de pommes de terre. La température fut maintenue à 45° afin que le léger gonflement produit permît une pénétration plus aisée de l'acide. Après les opérations habituelles, les divers produits ont été analysés par titrage potentiométrique à l'iode de l'amylose présent, et leur degré de polymérisation a été déterminé. Ces valeurs (voir tabl. 1) montrent que les deux constituants de l'amidon sont hydrolysés dans les mêmes proportions. La courbe (fig. 2) de l'adsorption de l'iode par l'amidon avant et après le traitement ne montre aucune augmentation de cette adsorption, donc aucune augmentation de la teneur en amylose, contrairement à ce qu'aurait fait prévoir l'hypothèse de Kerr.

¹⁾ R. W. Kerr, *Chemistry and Industry of Starch*, Academic Press, New York 1944.

Tableau 1.

Origine	CIH n.	T°	Durée d'hydrolyse min.	Degré moyen de polymérisation	
				Amylose	Amylopectine
Pommes de terre	—	—	—	556	1070
	—	45	330	560	1077
	0,235	45	60	513	906
	0,234	45	120	500	860
	0,234	45	180	405	825
	1,070	45	240	369	844
	1,080	45	300	294	605
	3,070	45	60	300	580
	3,070	45	180	210	411
Maïs	—	50	—	450	280
	—	50	330	450	275
	0,235	50	60	411	260
	0,235	50	180	377	239
	0,235	50	300	328	209
	1,010	50	60	315	198
	0,985	50	180	272	171



- amidon traité par CIH 0,2-n. 60 min. △ amidon traité par CIH 0,2-n. 180 min.
 ▼ amidon traité par CIH 0,2-n. 120 min. ◇ amidon traité par CIH 0,2-n. 240 min.
 ○ amidon non traité.

Fig. 2.

Dosage potentiométrique de l'adsorption d'iode par de l'amidon de pommes de terre avant et après traitement à l'acide chlorhydrique à 45°.

Notons toutefois que les cristallites de l'amidon, contrairement à ceux de la cellulose, présentent très peu de résistance aux agents chimiques en général (résultats confirmés par des attaques à l'acide periodique). Néanmoins nous croyons pouvoir dire que les régions cristallines comprennent aussi bien l'amylose que l'amylopectine et qu'il doit probablement s'agir de cristaux mixtes.

Des résultats du même ordre ont été obtenus avec de l'amidon de maïs auquel on avait attribué une structure plus cristallisée que celle de l'amidon de pommes de terre, du fait qu'il gonfle moins. A la lumière de nos résultats, ce phénomène semble toutefois pouvoir être aussi bien attribué au fait que les segments moléculaires de l'amidon de maïs sont plus courts.

Nature du polyholoside formant les membranes du grain. Lorsque l'on porte des grains d'amidon de pommes de terre dans une solution aqueuse d'iode, ils se colorent en bleu-violet. Lorsque l'on fait la même réaction avec de l'amidon dissous par un traitement à l'eau surchauffée, la coloration obtenue est nettement plus bleue. Cette constatation a permis à *Baker* et coll.¹⁾ de conclure à une accumulation d'amylose au centre du grain, alors que l'amylopectine se trouverait principalement à sa périphérie.

En détruisant mécaniquement des grains préalablement gonflés (pour les débarrasser de l'amylose A_1), nous avons pu séparer un produit constitué de fragments très peu solubles, provenant vraisemblablement de la membrane ou tout au moins de la couche périphérique du grain. L'analyse potentiométrique de cette fraction indique qu'elle est plus riche en amylopectine (4,3 % d'amylose contre 8,6 % dans le grain gonflé). Des résultats identiques ont été obtenus après une ébullition prolongée d'une suspension très diluée d'amidon: le résidu partiellement dissous, constitué de débris de membranes²⁾, contenait 4,7 % d'amylose au lieu de 19,2 % dans le grain entier. Dans les deux cas, les débris en suspension se colorent en violet avec l'iode.

Nous croyons donc pouvoir affirmer que le grain est effectivement entouré d'une membrane peu soluble dans l'eau, constituée principalement d'amylopectine.

Partie expérimentale.

Hydrolyse par l'acide chlorhydrique. L'amidon dégraissé à froid par 6 traitements à l'acétone, est ajouté sous légère agitation à de l'eau maintenue à 45° (suspension à 2%). Après 30 min., on ajoute la quantité voulue d'acide chlorhydrique concentré, puis on arrête la réaction à des temps donnés en neutralisant par NaOH. La suspension est centrifugée, le culot lavé à l'eau froide jusqu'à élimination des sels minéraux, puis à l'acétone et séché.

Le fractionnement des produits résultant de l'hydrolyse acide a été effectué selon les méthodes de *Schoch & Meyer*³⁾. 20 g d'amidon sont gélatinisés dans 1500 cm³ d'eau chaude, autoclavés à 110° durant 2 h., puis immédiatement additionnés de 10% de cyclohexanol bouillant. On laisse le mélange se refroidir lentement dans un récipient calorifugé, sous agitation continue, jusqu'à 4°, température que l'on maintient pendant 36 h. pour permettre la cristallisation du complexe cyclohexanol-amylose. On centrifuge ensuite la suspension après l'avoir agitée.

¹⁾ *F. Baker & W. J. Whelan*, J. sci. food agr. **1951**, 444.

²⁾ *A. Frey-Wyssling*, Exper. **8**, 101 (1952).

³⁾ *T. J. Schoch*, Adv. Carbohydrate Chem. **1**, 247 (1945); *K. H. Meyer & P. Rathgeb*, Helv. **31**, 1533 (1948).

Les culots sont lavés 3 fois à l'eau glacée saturée de cyclohexanol, redissous dans 400 cm³ d'eau bouillante saturée de cyclohexanol, puis traités à nouveau comme précédemment. Pour purifier davantage le produit on peut répéter toute l'opération. Après le dernier traitement, on centrifuge, lave les culots 3 fois à l'eau glacée saturée de cyclohexanol, 3 fois à l'alcool, 2 fois à l'éther ordinaire, 1 fois à l'éther sec, puis triture le produit jusqu'à obtention d'une poudre sèche.

La solution surnageante contenant l'amylopectine est réchauffée à 100°, puis refroidie comme avant, pour la débarrasser des restes d'amylose. Après centrifugation, le cyclohexanol est éliminé sous vide, la solution portée à 3 l et ajustée à pH 5 par quelques gouttes d'acide acétique n.

On ajoute alors sous forte agitation, 2 g d'acide stéarique dissous dans env. 20 cm³ d'alcool; après 1 h. on filtre sur «Filter Cel»¹⁾ et concentre le filtrat à 1 l. On précipite l'amylopectine en versant, toujours sous forte agitation, la solution refroidie à 0°, goutte à goutte dans 2 l de méthanol, centrifuge, lave les culots 3 fois à l'alcool, 2 fois à l'éther ordinaire, 1 fois à l'éther sec, puis triture le produit jusqu'à obtention d'une poudre sèche.

Action de la chaleur sur le gonflement des grains d'amidon. L'amidon est chauffé, à la pression atmosphérique, au bain d'huile, à 150°. Pour mesurer le gonflement, on ajoute à 95 cm³ d'eau (pH 7) maintenus dans un bain-marie bouillant, sous faible agitation des prises de 1 g d'amidon suspendus dans 5 cm³ d'eau froide. Après 30 min. on prélève 10 cm³ que l'on centrifuge à 3500 t/min. dans un tube gradué. Le volume occupé par le culot est considéré comme mesure arbitraire du gonflement.

La quantité d'amidon qui s'est dissoute lors de cette opération, est dosée à l'anthrone²⁾.

Destruction mécanique des granules. Elle s'effectue sur des grains préalablement débarrassés de l'amylose A₁. Pour ceci, on verse sous lente agitation, une suspension d'amidon, dans de l'eau portée à 70° (concentration finale d'amidon 1%) et la maintient 1 h. à cette température. On laisse refroidir, centrifuge et répète l'opération 2 fois encore. Ces grains gonflés et totalement débarrassés de l'amylose A₁, sont détruits par un traitement de 1 min. au «Waring Blendor» (13000 t/min.). On centrifuge à 2000 t/min., recueille la solution surnageante et lave les culots 3 fois à l'eau froide. Les culots lavés sont dissous par autoclavage de 2 h. à 110°.

Un dosage potentiométrique est alors effectué sur la solution surnageante de la première centrifugation ainsi que sur la solution des culots.

Dosage potentiométrique de l'amylose. Env. 50 mg d'amidon sont placés dans un ballon jaugé de 25 cm³. On ajoute 10 cm³ de KOH 2,5-n., conserve la suspension à 40° pendant 12 h. puis complète la solution obtenue au volume par de l'eau distillée. Sur une première prise de 10 cm³ on dose le glucose après hydrolyse. Une seconde prise est placée dans un bécher de 250 cm³ et amenée à pH 4,5–5,0 par ClH n. On ajoute 0,8303 g de KI et porte le volume à 100 cm³. On ajoute alors au moyen d'une burette (20°; agitation par courant d'azote) une solution d'iode 0,001-m. contenant KCl 0,05-n. et KI 0,05-n., en suivant le potentiel au moyen d'une électrode au calomel saturé, l'autre électrode étant constituée par un fil de platine. Au cours d'un essai à blanc, effectué sans amidon, on détermine la variation du potentiel en fonction de quantités croissantes d'iode. La quantité d'iode adsorbée par le polysaccharide, est exprimée en fonction de l'iode libre dans la solution après extrapolation à une concentration nulle d'iode libre. Alors que l'amylopectine n'adsorbe pas d'iode, l'amylose de pommes de terre en fixe 21%, ce qui permet de déterminer la proportion d'amylose dans l'échantillon.

Mesure du poids moléculaire. Elle a été effectuée par la méthode réductométrique de *Bernfeld & Noelting*³⁾, modifiée par *K. H. Meyer & C. P. Feng*⁴⁾.

¹⁾ «Cellite» 535 de *Johns Manville*.

²⁾ *Ed. H. Fischer & L. Kohtés*, *Helv.* **34**, 1129 (1951).

³⁾ *K. H. Meyer, G. Noelting & P. Bernfeld*, *Helv.* **31**, 103 (1948).

⁴⁾ *K. H. Meyer & C. P. Feng*, *Helv.*, sous presse.

SUMMARY.

The fine structure of potato and maize starch granules has been studied.

(1) The action of heat on the swelling of the granules has been examined. Treatment at temperatures up to 150°C diminishes the swelling in water although there is an increase in dextrinisation. This phenomenon is attributed to a growth of small crystallites at the expense of the free molecular segments, on the presence of which the swelling depends. The granules become entirely soluble at 170°.

(2) The crystallites of the granules contain amylopectine as well as amylose; this fact suggests the possible existence of mixed crystals.

(3) It has been confirmed that the "membrane" of the outer layer of the granules contains mainly amylopectine.

Laboratoire de chimie organique et
inorganique de l'Université de Genève.

38. Synthese von N-Methyl-5,6-dioxy-indoxyl (Adrenolutin)

von R. W. Balsiger¹⁾, R. W. Fischer, R. Hirt und E. Giovannini.

(14. III. 53.)

In den Arbeiten von A. Lund²⁾ wird einem fluoreszierenden Umwandlungsprodukt des Adrenochroms (I), Adrenolutin genannt, die Konstitution eines N-Methyl-5,6-dioxy-indoxyls (II a) zugeschrieben. Dieser Autor erhielt II a beim Behandeln von Adrenochrom in sauerstoff-freier Lösung mit Alkali und nachfolgender Ausfällung mit Säure. Schon vorher hatte J. Harley-Mason³⁾ bei der Reduktion von Adrenochrom zwei Substanzen isoliert, deren eine er als 2,3,5,6-Tetrahydroxy-N-methyl-dihydroindol bezeichnete. Aus dieser konnte er mit Acetanhydrid-Pyridin das Triacetat II b darstellen. Später wurden die Befunde von A. Lund durch P. Fischer⁴⁾ und J. Harley-Mason⁵⁾ bestätigt.

Diese Arbeiten zeigen, dass Adrenochrom sich leicht in eine isomere Verbindung, das Adrenolutin, überführen lässt; die Strukturformel II a für Adrenolutin ist aber noch nicht endgültig bewiesen. Da

¹⁾ Auszug aus der Diss. R. W. Balsiger, Universität Fribourg, die demnächst erscheint.

²⁾ A. Lund, Acta pharmacol. 5, 83, 121 (1949).

³⁾ J. Harley-Mason, Exper. 4, 307 (1948).

⁴⁾ P. Fischer, Soc. Chim. Belge 58, 205 (1949); P. Fischer, G. Derouaux, H. Lambot & J. Lecomte, Soc. Chim. Belge 59, 72 (1950).

⁵⁾ J. Harley-Mason, Soc. 1950, 1276; J. D. Bu'Lock & J. Harley-Mason, Soc. 1951, 712.