

verwendeten. Anscheinend haben *Kiss* und *Gerendás* als Vergleichslösung Wasser verwendet. Sie setzten dem Chromat 0,05-n. Kalilauge zu. Wir konnten feststellen, dass das Chromatspektrum zwischen 215 und 225 m $\mu$  unabhängig davon ist, ob man 0,001-n. oder 0,01-n. Lauge verwendet, das heisst, dass die erstere bereits genügt, die Bildung von Bichromationen genügend zurückzudrängen. Für das kurzwelligste Stück verwendeten wir dann 0,001-n. Lauge, da andernfalls die erhebliche Absorption der Lauge<sup>1)</sup> eine entsprechende Erhöhung der Expositionszeit bedingt hätte<sup>2)</sup>.

Für Eichzwecke im kurzwelligen Gebiet eignet sich aus den oben angeführten Gründen die Chromatkurve viel besser als die Pikratkurve. Wir geben deshalb nicht nur die Kurve (vgl. Fig. 1) sondern auch in einer Tabelle die Werte von  $\log \varepsilon$  für runde Werte von  $1/\lambda$ .

Zürich, Physikalisch-Chemisches Institut der Universität.

## 5. Recherches sur l'amidon IX.

### Dégradation par la $\beta$ -amylase et loi d'action des masses

par Kurt H. Meyer et J. Press.

(27. XII. 40.)

Au cours de nos recherches sur la dégradation des constituants de l'amidon par la  $\beta$ -amylase, nous avons été portés à examiner d'une manière systématique l'influence que pouvait avoir la concentration du substratum et celle du ferment sur la vitesse de la dégradation. La présente note se rapporte à ces recherches.

Plusieurs travaux ont déjà été consacrés à l'étude de ce problème, notamment par *Henri*<sup>3)</sup>, *Philoché*<sup>4)</sup>, *Sherman* et *Walker*<sup>5)</sup>, *Euler* et *Svanberg*<sup>6)</sup>, *Lüers* et *Wasmund*<sup>7)</sup>. Ces auteurs ont travaillé cependant avec de l'amylase de malt, c'est-à-dire avec un mélange d'amylases  $\alpha$  et  $\beta$ , de sorte que leurs résultats ne permettent pas de résoudre les questions posées plus haut. Nous avons effectué des séries d'essais en faisant varier la concentration de l'enzyme à concentration constante du substratum, ceci pour diverses concentrations d'amidon.

<sup>1)</sup> Vgl. Fussnote 2, Seite 49.

<sup>2)</sup> In der Figur sind diese Punkte mit Kreuzen, die mit 0,01-n. Lauge mit Kreisen bezeichnet und man sieht, dass beide Arten von Punkten auf einer Kurve liegen.

<sup>3)</sup> V. Henri, Thèse Paris 1903.

<sup>4)</sup> Ch. Philoché, J. Chim. phys. **6**, 212, 355 (1908).

<sup>5)</sup> H. C. Sherman et J. A. Walker, Am. Soc. **39**, 1476 (1917).

<sup>6)</sup> H. v. Euler et O. Svanberg, Z. physiol. Ch. **112**, 193 (1921).

<sup>7)</sup> H. Lüers et W. Wasmund, Fermentforschung **5**, 169 (1921).

Comme l'amidon naturel, n'ayant subi aucune altération chimique, et ses constituants ne donnent que des solutions instables et présentent le phénomène du vieillissement rendant difficile une détermination précise de vitesses de réaction, nous avons utilisé comme substratum pour les premiers essais fondamentaux, un « amidon soluble selon *Zulkowski* » (de la maison *Schering-Kahlbaum*). Notre échantillon donnait des solutions limpides dans de l'eau; une solution récente et une autre, vieille de trois semaines, étaient dégradées à la même vitesse par les mêmes quantités de ferment: la solution ne vieillissait donc pas (cf. essais N<sup>os</sup> 9 et 18).

L'enzyme a été préparé selon les indications données dans le mémoire VIII<sup>1)</sup>, précipité par l'alcool et dissous à environ 2%; quelques gouttes de cette solution ont été pesées et introduites dans la solution d'amidon de la manière décrite plus loin. Dans tous nos essais, la réaction a été d'ordre zéro: jusqu'à un taux de dégradation de 35—40 %, la quantité de maltose formée par unité de temps restait constante.

Aux concentrations élevées en amidon (0,6—1,4 %), cette constatation ne permet pas de tirer des conclusions particulières; en effet, comme nous en ferons la remarque tout à l'heure, la vitesse de la réaction est dans ce cas pratiquement indépendante de la concentration du substratum si bien qu'une certaine diminution de la concentration de ce dernier ne saurait la modifier. Mais nous avons pu constater la même allure d'ordre zéro de la réaction aux concentrations plus faibles en amidon, auxquelles cette concentration a une influence marquée sur la vitesse (essais 10 à 17): ici, nous pouvons tirer la conclusion que jusqu'à un degré d'hydrolyse de 30—40 %, la concentration des groupes terminaux ne subit pas de variation (cf. le mémoire VIII).

Dans le tableau suivant, on trouvera les valeurs du quotient  $V$  représentant le rapport: vitesse de réaction  $v$  à la concentration du

Tableau 1.

$v/E = V$ , en fonction des concentrations du ferment et de l'amidon.

Concentration de l'amidon	Concentration du ferment		
	~ 0,4	~ 0,2	~ 0,1
1,4	0,064	0,066	0,064
1,0	0,070	0,070	0,069
0,6	0,064	0,062	0,064
0,4	0,047	0,048	0,048
0,2	0,026	0,032	0,028
0,1			0,022
0,05			0,013

<sup>1)</sup> Helv. 23, 1465 (1940).

ferment E; la vitesse de réaction est mesurée par la quantité d'hydrate de maltose, exprimée en grammes, formée dans 100 cm<sup>3</sup> par minute. La première ligne indique les concentrations du ferment, la première colonne celles de l'amidon (en gr. C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> par 100 cm<sup>3</sup>).

Ce tableau montre qu'à concentration constante de l'amidon, le quotient V reste constant; en outre, on y voit qu'aux concentrations élevées de l'amidon, V tend vers une limite. L'existence de cette « valeur-limite » s'explique si on suppose que *le ferment forme une combinaison d'addition avec le substratum, combinaison en équilibre de dissociation avec le ferment libre et le substratum libre et se décomposant lentement en produits de dégration et en ferment*. Dans ce cas, la concentration v' de la « combinaison intermédiaire » est proportionnelle à la vitesse de réaction  $v = v'k$ . En présence d'un excès d'amidon, la dissociation en est entravée et la totalité du ferment se trouve transformée pratiquement en cette combinaison, si bien qu'une nouvelle addition d'amidon n'a plus d'effet sur la vitesse de la dégradation.

En appliquant la loi d'action des masses à l'interprétation quantitative de nos résultats, nous suivons l'exposé de *Henri* et surtout celui de *Michaelis* et *Menten*<sup>1)</sup>; l'étude bien connue de l'inversion du saccharose par l'invertine faite par ces derniers auteurs indique la voie à suivre pour le traitement de ce problème.

Si A signifie la concentration initiale de l'amidon, E celle initiale du ferment, v' celle de la combinaison d'addition, et partant  $A - v'$  et  $E - v'$ , respectivement les concentrations équivalentes de l'amidon et du ferment à l'état d'équilibre, et si K<sub>s</sub> indique la constante de dissociation, on pourra établir pour une combinaison de ferment et d'amidon en équilibre de dissociation la relation suivante:

$$\frac{(A - v')(E - v')}{v'} = K_s$$

Comme A est très grand par rapport à v', on peut dans ce cas remplacer  $A - v'$  par A, ce qui donne:

$$\frac{A(E - v')}{v'} = K_s \quad (1)$$

$$v' = E \frac{A}{A + K_s}; \quad V = \frac{v}{E} = \frac{v'k}{E} = \frac{k \cdot A}{A + K_s} \quad (2)$$

Il résulte immédiatement de ces équations que  $v/E$  doit être constant pour une concentration déterminée et constante de l'amidon, résultat qui découlait déjà de nos expériences. En représentant V en fonction de log A, on doit obtenir une courbe en s en application de la relation mathématique établie entre ces deux grandeurs (« courbe de résidu de dissociation »). Comme le montre la fig. 1, c'est effectivement le cas. Aux valeurs croissantes de log A, V tend vers une limite correspondant à la transformation intégrale du ferment en combinai-

<sup>1)</sup> L. Michaelis et M. L. Menten, Biochem. Z. 49, 333 (1913).

son d'addition non dissociée. La valeur obtenue pour 1,4 % d'amidon s'écarte quelque peu du tracé de la courbe, pour des raisons que nous n'avons pu élucider. La valeur-limite permet de déterminer à quelle concentration du substratum juste la moitié de la combinaison intermédiaire est dissociée, ce qui rend  $E-v'$  égal à  $v'$ . Cette concentration

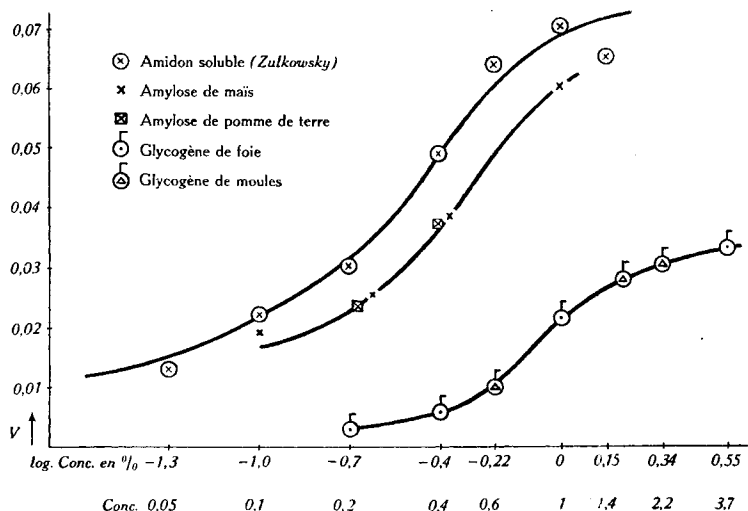


Fig. 1.

est représentée par l'abscisse du point d'inflexion, qui correspond à la moitié de la valeur limite de  $V$ . En introduisant cette valeur dans l'équation (1), on obtient  $A = K_s$ , c'est-à-dire que cette valeur particulière de  $A$  est égale à la constante de dissociation de la combinaison ferment-substratum. Comme poids équivalent du substratum, c'est-à-dire de l'amidon, il y a lieu d'adopter le poids de la fraction d'amidon qui contient un groupe entrant en réaction avec le ferment, soit un « groupe terminal ». Dans l'amidon de pomme de terre, nous en avons un pour 20—25 restes de glucose; le poids équivalent s'établit par conséquent à  $\sim 4000$  (rapporté à  $C_6H_{12}O_6$ ). Le point d'inflexion correspond à une concentration de l'amidon de 0,3 gr./100  $cm^3$ , soit à une solution  $n/1300$ ; la constante de dissociation de la combinaison d'addition groupe terminal- $\beta$ -amylase s'établirait alors à

$$K_s = 0,0008.$$

Lüers et Wasmund avaient admis dans leurs essais un poids moléculaire du substratum de 1500; ce chiffre donne la valeur de

$$K_s = 0,002,$$

tandis que ces auteurs avaient trouvé avec un mélange des amylases  $\alpha$  et  $\beta$  le chiffre de 0,00032.

*Inhibition par le maltose:* Le maltose formé fixe du ferment et entrave ainsi le progrès de l'hydrolyse; dans une solution d'amidon

de 0,6 %, nous constatons un abaissement de la vitesse de dégradation d'environ 20 % par suite de l'addition de 0,6 % de maltose (essais 19 et 8). Ce phénomène était du reste déjà connu.

### *Dégradation de l'amylose.*

Après ces essais qui ont servi de point de départ, nous avons poursuivi nos recherches sur l'amylose chimiquement non altéré.

Pour extraire l'amylose, l'amidon de maïs a été traité par de l'eau à 70° et l'amidon de pomme de terre par de l'eau à 60°. Les amyloses se séparent de la solution par cristallisation, après quelques semaines; les propriétés chimiques et physiques des deux produits sont les mêmes; exemples: leur viscosité et leur teneur en groupes terminaux.

Pour exclure l'effet du vieillissement pendant la dégradation enzymatique, nous avons utilisé des solutions alcalines diluées, fraîchement préparées; ces solutions ont été portées à un  $p_H$  de 4,8, avant l'addition de l'enzyme. Les résultats obtenus sont donnés dans la fig. 1 et dans la partie expérimentale.

Ces deux amyloses montrent le même comportement vis-à-vis de l'amylase. Pour obtenir la même vitesse  $V$ , il faut que la concentration de l'amylose soit 1,5 fois celle de l'amidon de *Zulkowsky*. Ce résultat est inattendu; on pouvait prévoir une différence plus marquée entre l'amidon et l'amylose, étant donné que l'amylose ne contient que  $\frac{1}{10}$  des groupes terminaux d'une même quantité d'amidon.

Malheureusement, la valeur limite de  $V$  ne peut pas être déterminée, car au-dessus d'une concentration de 1 % d'amylose, l'aggrégation (vieillessement) intervient trop rapidement et rend la mesure exacte impossible. Selon toute probabilité, on peut supposer d'après l'allure de la courbe (II), que la valeur limite de  $V$  est la même que pour l'amidon soluble. Dans ce cas, une concentration de 0,5 gr. d'amylose correspond à la moitié de la valeur limite (point d'inflexion). Pour un poids moléculaire de 50 000, on a une solution normale de 1/10 000 et ceci signifie en même temps, étant donné que l'amylose n'est pas ramifié, que la concentration est équivalente. La constante de dissociation de la combinaison intermédiaire enzyme-amylose est donc estimée à  $K = 0,0001$ . Elle est donc beaucoup plus petite que celle de l'amidon soluble. Cependant, nous ne désirons tirer cette conclusion qu'avec toute réserve.

### **Partie expérimentale.**

Préparations des solutions d'amidon de *Zulkowsky*:

A partir d'une solution initiale d'amidon à 2,3% on fait des prises de telle manière qu'on arrive aux concentrations finales suivantes: 1,4%, 1%, 0,6%, 0,4%, 0,2%, 0,1% et enfin 0,05%.

Dans chaque essai, on laisse la prise en présence de 15 cm<sup>3</sup> NaOH 2-n. pendant 10 minutes. On neutralise la soude par 15 cm<sup>3</sup> CH<sub>3</sub>COOH 4-n.

Le volume est complété presque à 100 cm<sup>3</sup> dans un ballon jaugé.

On laisse la solution prendre la température de 35° au thermostat.

Puis on ajoute l'enzyme de la façon suivante:

Tableau 2.

*Action de la  $\beta$ -amylase sur l'amidon soluble.*

Essais N <sup>o</sup>	Conc. d'amidon en gr. pour 100 cm <sup>3</sup> de sol.	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm <sup>3</sup> de sol.	Temps en min.	cm <sup>3</sup> KMnO <sub>4</sub> 0,1-n. pour 10 cm <sup>3</sup> de prise	Hydrate de maltose formé pour 100 cm <sup>3</sup> en gr.	% hydrolysé	$\frac{X}{t \cdot E} = V$
	A	E	t		X		V
1	1,4	0,405	5	2,2	0,13	9,3	0,064
			10	4,4	0,26	18,6	0,064
			15	6,5	0,39	27,9	0,064
			30	8,0	0,49	35,0	0,040
2	1,4	0,192	7,5	1,6	0,095	6,8	0,066
			15	3,2	0,19	13,6	0,066
			30	5,5	0,33	23,5	0,057
			45	7,65	0,465	33	0,054
3	1,4	0,125	15	2,0	0,12	8,6	0,064
			30	4,0	0,24	17,2	0,064
			45	5,0	0,30	21,5	0,053
			75	7,0	0,43	30,5	0,046
4	1	0,416	5	2,45	0,145	14,5	0,070
			10	4,9	0,29	29	0,070
			15	6,95	0,42	42	0,067
			30	8,3	0,51	51	0,041
5	1	0,210	7,5	1,8	0,11	11	0,070
			15	3,6	0,22	22	0,070
			30	6,65	0,405	40,5	0,064
			45	8,3	0,505	50,5	0,054
6	1	0,092	15	1,6	0,095	9,5	0,069
			30	3,2	0,19	19	0,069
			45	4,8	0,285	28,5	0,069
			75	7,0	0,43	43	0,062
7	0,6	0,425	5	2,25	0,135	22,5	0,064
			10	4,5	0,27	45	0,064
			15	5,0	0,30	50	0,047
			30	5,15	0,31	52	0,024
8	0,6	0,206	7,5	1,6	0,095	16	0,0615
			15	3,2	0,19	32	0,0615
			30	4,6	0,28	47	0,045
			45	5,0	0,30	50	0,032
9	0,6	0,0945	15	1,5	0,09	15	0,0635
			30	3,0	0,18	30	0,0635
			45	4,5	0,27	45	0,0635
			75	5,0	0,30	50	0,042
10	0,4	0,387	5	1,5	0,09	22,5	0,047
			10	3,0	0,18	45	0,047
			15	3,25	0,195	49	0,034
			30	3,35	0,20	50	0,017

Tableau 2 (suite).

Essais N°	Conc. d'amidon en gr. pour 100 cm³ de sol.	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm³ de sol.	Temps en min.	cm³ KMnO₄ 0,1-n. pour 10 cm³ de prise	Hydrate de maltose formé pour 100 cm³ en gr.	% hydrolysé	$\frac{X}{t \cdot E} = V$
	A	E	t		X		V
11	0,4	0,215	7,5	1,3	0,078	19,5	0,048
			15	2,6	0,156	39	0,048
			30	3,25	0,195	49	0,030
			45	3,45	0,21	52,5	0,022
12	0,4	0,094	15	1,15	0,068	17	0,048
			30	2,3	0,136	34	0,048
			45	2,85	0,17	42	0,040
			75	3,35	0,20	50	0,028
13	0,2	0,380	5	0,85	0,050	25	0,026
			10	1,7	0,10	50	0,026
			15	1,75	0,105	52,5	0,018
			30	1,8	0,11	55	0,010
14	0,2	0,187	7,5	0,75	0,045	22,5	0,032
			15	1,5	0,09	45	0,032
			30	1,6	0,095	47,5	0,017
			45	1,7	0,10	50	0,012
15	0,2	0,114	15	0,8	0,048	24	0,028
			30	1,6	0,086	48	0,028
			45	1,8	0,105	52,5	0,0205
			75	1,85	0,11	55	0,013
16*)	0,1	0,092	10	0,325	0,020	20	0,022
			20	0,65	0,040	40	0,022
			30	0,7	0,042	42	0,015
			60	0,8	0,048	48	0,0087
17**)	0,05	0,094	5	0,10	0,0063	12,6	0,013
			10	0,20	0,0126	25,2	0,013
			15	0,28	0,017	34	0,012
			30	0,30	0,018	36	0,0064
Solution d'amidon laissée à 0° pendant 14 jours: vieillissement.							
18	0,6	0,097	15	1,5	0,09	15	0,062
			30	3	0,18	30	0,062
			45	4,5	0,27	45	0,062
			75	5,15	0,31	52	0,043
Empêchement de l'hydrolyse enzymatique par le maltose: addition de 25 cm³ contenant 0,52 gr. de maltose.							
19***)	0,6	0,0995	15	1,3	0,078	13	0,052
			30	2,6	0,156	26	0,052
			45	3,9	0,234	39	0,052
			75	4,8	0,290	48	0,039

\*) dans l'essai N° 16, on a fait l'analyse sur des prises de 20 cm<sup>3</sup>.

\*\*) dans l'essai N° 17, on a fait l'analyse sur des prises de 50 cm<sup>3</sup>.

\*\*\*) dans l'essai N° 19, on a fait l'analyse sur des prises de 5 cm<sup>3</sup>. L'essai à blanc donnait 4,5 cm<sup>3</sup> KMnO<sub>4</sub> 0,1-n. dû à la présence du maltose.

Au moyen d'une pipette qu'on pèse avant et après l'usage on introduit 4, 8, ou 16 gouttes de  $\beta$ -amylase dans un petit entonnoir à robinet ou mieux sur un verre de montre. On verse l'enzyme dans le ballon jaugé contenant la solution d'amidon d'un seul coup; on lave l'entonnoir ou le verre de montre avec un peu d'eau de telle façon que le niveau atteigne exactement le trait de jauge dans le ballon jaugé.

A = concentration en gr. d'amidon pour 100 cm<sup>3</sup> de solution

E = gr. d'enzyme pour 100 cm<sup>3</sup> de solution

X = gr. hydrate de maltose hydrolysé pendant le temps = t

$$\frac{X}{t \cdot E} = V$$

*Détermination de l'activité de l'enzyme.*

L'enzyme a été précipité et puis redissous dans l'eau. 1 cm<sup>3</sup> de cette solution est dilué avec 24 cm<sup>3</sup> d'eau. Une prise de 1 cm<sup>3</sup> de cette dernière solution donne 27,5 mgr. maltose<sup>1)</sup>.

Préparation des solutions d'amylose: On dissout la quantité désirée d'amylose dans 15 cm<sup>3</sup> de NaOH 2-n. dans un ballon de 100 cm<sup>3</sup> jaugé; on porte la solution à 35° dans un thermostat, puis on ajoute 15 cm<sup>3</sup> de CH<sub>3</sub>COOH 4-n. ayant aussi la température de 35° et en même temps qu'on ajoute l'acide, on laisse tomber un petit godet contenant l'enzyme. La solution d'enzyme était la même qu'on avait utilisée pour les essais antérieurs.

**Tableau 3.**

*Action de la  $\beta$ -amylase sur l'amylose de maïs.*

Essais N°	Conc. d'amylose en gr. pour 100 cm <sup>3</sup>	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm <sup>3</sup>	Temps en min.	cm <sup>3</sup> KMnO <sub>4</sub> 0,1-n.	gr. Hydrate de maltose formé	% hydrolysé	$V = \frac{X}{t \cdot E}$
	a	E	t		X		V
1	1,0	0,402	5	2	0,12	12	0,060
			10	3,1	0,185	18,5	0,046
			15	3,85	0,23	23	0,038
			30	4,2	0,25	25	0,021
2	0,43	0,375	2,5	0,6	0,036	8,4	0,038
			5	1,2	0,072	16,8	0,038
			10	2,4	0,144	33,6	0,038
			30	2,5	0,148	34,4	0,013
3	0,236	0,38	5	0,8	0,048	20,3	0,025
			10	1,6	0,096	40,6	0,025
			15	2	0,12	50,8	0,021
			30	2,4	0,14	59,3	0,012
4	0,1	0,384	2,5	0,3	0,018	18	0,019
			5	0,6	0,036	36	0,019
			10	1,2	0,072	72	0,019
			30	1,3	0,078	78	0,0067

<sup>1)</sup> Voir méthode: Helv. 23, 1471 (1940).



**Tableau 4.***Action de la  $\beta$ -amylase sur l'amylose de pomme de terre.*

Essais N <sup>o</sup>	Conc. de d'amylose en gr. pour 100 cm <sup>3</sup>	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm <sup>3</sup>	Temps en min.	cm <sup>3</sup> KMnO <sub>4</sub> 0,1-n.	gr. Hydrate de maltose formé	% hydrolysé	$V = \frac{X}{t \cdot E}$
	a	E	t		X		V
1	0,4	0,425	2,5	0,65	0,039	9,75	0,037
			5	1,3	0,078	19,5	0,037
			10	2	0,12	30	0,028
			30	4	0,24	60	0,019
2	0,21	0,417	2,5	0,4	0,024	11,4	0,023
			5	0,8	0,048	22,8	0,023
			10	1,1	0,066	31,4	0,016
			30	2,2	0,13	62	0,010

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

## 6. Recherches sur l'amidon X.

### La dégradation du glycogène par la $\beta$ -amylase

par Kurt H. Meyer et J. Press.

(27. XII. 40.)

Nous avons examiné la dégradation du glycogène par la  $\beta$ -amylase d'après la méthode décrite dans notre précédent travail. Nous avons utilisé la solution d'enzyme que nous avons employée dans nos recherches sur l'amidon soluble et sur l'amylose. Deux glycogènes différents étaient à notre disposition, tous les deux préparés d'après la méthode de *Brücke*, le glycogène extrait du foie de bœuf (préparé par *Hoffmann-La Roche*) et le glycogène de *Merck* extrait des moules. Ils se sont comportés d'une façon identique lors des essais de dégradation. Avec une forte concentration d'enzyme, on peut arriver à une dégradation de 45 % avec formation de 55 % de dextrine résiduelle.

Les préparations de glycogène se dissolvent facilement dans l'eau et la solution reste légèrement trouble. Elles ont été attaquées excessivement lentement par la  $\beta$ -amylase. Si l'on rend la solution faiblement alcaline et qu'on l'acidule ensuite, l'attaque se fait régulièrement et on obtient des valeurs pour les vitesses initiales qui prouvent d'une façon certaine qu'elles ne sont pas dues au hasard, ainsi que