

Tableau 4.*Action de la β -amylase sur l'amylose de pomme de terre.*

Essais N ^o	Conc. de d'amylose en gr. pour 100 cm ³	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm ³	Temps en min.	cm ³ KMnO ₄ 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 β -amylase

par Kurt H. Meyer et J. Press.

(27. XII. 40.)

Nous avons examiné la dégradation du glycogène par la β -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 β -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

le montre la courbe de la fig. 1 du travail précédent. Après quelques jours, la solution acidulée perd sa sensibilité vis-à-vis de l'enzyme: la solution a vieilli. Aussi bien dans une solution fraîche, qui n'a pas été traitée par l'alcali, que dans une solution vieillie, le glycogène se trouve dans un autre état que celui qu'il possède dans une solution rafraîchie. Nous supposons qu'en état d'équilibre il est associé en plus grands paquets (en « micelles » non cristallines). Ces paquets sont désagrégés par la lessive alcaline et après neutralisation ils s'aggrègent lentement, à nouveau.

Les valeurs pour $\frac{v}{E}$ sont rapportées dans la fig. 1 du précédent travail. Par rapport à l'amidon soluble les deux produits montrent deux différences:

1° La concentration en glycogène qui est nécessaire pour atteindre la vitesse de saturation ou la demi-vitesse de saturation (point d'inflexion) est beaucoup plus grande que celle de l'amidon soluble.

2° On remarque que la valeur limite de V n'est que la moitié environ de la valeur correspondante de l'amidon soluble. Or V est le quotient de v et de la concentration d'enzyme; mais v est le produit de deux facteurs dont la valeur absolue est inconnue, facteurs qui sont la concentration de la combinaison intermédiaire et la vitesse de décomposition de cette dernière. Cet abaissement de V peut être dû soit au fait que la combinaison intermédiaire glycogène-enzyme se décompose plus lentement que celle amidon-enzyme, soit au fait qu'une partie de l'enzyme forme quelque autre combinaison d'addition qui ne se décompose plus ultérieurement, de telle sorte que la concentration de la combinaison active est abaissée. Il n'est pas exclu que certains endroits de la molécule de glycogène, dont la structure est très ramifiée, fixent l'enzyme et que de telles combinaisons d'addition soient inactives.

Dégradation du lyo-glycogène par la β -amylase.

Les recherches faites jusqu'ici se rapportaient à des préparations de glycogène qui ont été purifiées de toutes leurs protéines par traitement avec une lessive alcaline à 40 %. Il est possible que par ce traitement brutal, le glycogène subisse une modification quelconque; nous avons donc examiné un glycogène qui a été obtenu d'une façon plus élégante. Ainsi que *R. Willstätter* et *M. Rohdewald*¹⁾ l'ont démontré dans un important travail, le glycogène se trouve aussi bien dans le foie que dans les muscles, sous des formes qui sont liées plus ou moins fortement aux constituants de la cellule: une partie du glycogène ne se laisse pas extraire par l'eau bouillante, mais seulement par un long traitement avec de l'alcali concentré. Ce glycogène a été nommé desmo-glycogène par *Willstätter* et *Rohdewald*.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **225**, 103 (1934).

Tableau 1.

Action de la β -amylase sur le glycogène du foie de vache.

Essais N°	Conc. de glycogène en gr. pour 100 cm ³	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm ³	Temps en min.	cm ³ KMnO ₄ 0,1-n. pour 10 cm ³ de prise	gr. hydrate de maltose formé	% hydrolysé	$V = \frac{X}{t \cdot E}$
	a	E	t		X		V
1	0,2	0,396	10	0,2	0,0125	6,25	0,00315
			20	0,4	0,025	12,5	0,00315
			30	0,5	0,030	15	0,0025
			60	0,75	0,045	22,5	0,0019
2	0,4	0,38	10	0,35	0,021	5,25	0,0055
			20	0,7	0,042	10,5	0,0055
			30	0,75	0,045	11,25	0,0039
			60	0,1	0,066	16,5	0,0029
3	0,6	0,375	5	0,3	0,018	3	0,0096
			10	0,6	0,036	6	0,0096
			15	0,8	0,048	8	0,0085
			30	1,2	0,072	12	0,0064
4	1	0,37	2,5	0,325	0,02	2	0,0216
			5	0,65	0,04	4	0,0216
			10	1	0,06	6	0,016
			30	2	0,12	12	0,011
5	1,6	0,34	5	0,8	0,048	3	0,028
			10	1,6	0,096	6	0,028
			15	2,3	0,136	8,5	0,026
			30	2,9	0,172	10,75	0,017
6	2,2	0,20	2,5	0,25	0,015	0,68	0,030
			5	0,5	0,030	1,36	0,030
			10	1	0,06	2,72	0,030
			30	3	0,18	8,16	0,030
7	3,7	0,36	2,5	0,5	0,03	0,8	0,033
			5	1	0,06	1,6	0,033
			10	2	0,12	3,2	0,033
			30	5,4	0,32	8,65	0,029

Remarques: Pour les essais 1, 2, 3, 4 on a préparé une solution dans un ballon jaugé de 100 cm³ et on a fait des prises de 20 cm³ chaque fois.

Pour les essais 5, 6, 7 on a préparé une solution dans un ballon jaugé de 50 cm³, et on a fait des prises de 10 cm³ chaque fois.

Une autre partie, dont la quantité peut varier considérablement et qui peut même être nulle, est soluble dans l'eau chaude. Il est désigné comme lyo-glycogène. Pour étudier le comportement du lyo-glycogène vis-à-vis de l'attaque enzymatique, on a nourri quatre moules d'eau douce (Anodonte) avec de la semoule cuite et du glucose pendant

quelques jours, puis on les a hachées, à basse température, dans un hache-viande. On les a ensuite portées dans 2 litres d'eau bouillante. La solution contenait après centrifugation environ 0,2 % de glycogène et 0,07 % de protéine. La solution, alcalinisée puis neutralisée, n'est pas attaquée par la β -amylase. Dans le « symplex » glycogène-protéine, le glycogène est donc protégé de l'action de la β -amylase. Si, par contre, on précipite les protéines par l'acide tungstique d'après *O. Folin* et *H. Wu*¹⁾, le glycogène est attaqué par la β -amylase. Comme le montre l'essai N° 11, l'attaque est plus rapide que celle du glycogène *Brücke*. D'autres essais seront nécessaires pour élucider la cause de cette différence.

Partie expérimentale.

Les solutions de glycogène ont été préparées comme celles de l'amidon de *Zulkowsky*²⁾. Chaque concentration de glycogène désirée a été mise en présence de 15 cm³ NaOH 2-n. pendant 15 minutes environ. Puis la soude a été neutralisée par 15 cm³ CH₃COOH 4-n.

L'effet du vieillissement a été constaté sur une solution de glycogène (produit *Hoffmann-La Roche*) à 0,2 %; cette solution, laissée pendant 13 jours en présence de la soude neutralisée par l'acide acétique, ne subit plus l'hydrolyse enzymatique que très lentement. On peut rajeunir la solution par la soude et dans ce cas on obtient le même résultat que dans l'essai I.

Tableau 2.

Action de la β -amylase sur le glycogène de mouton.

Essais N°	Conc. de glycogène en gr. pour 100 cm ³	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm ³	Temps en min.	cm ³ KMnO ₄ 0,1-n. pour 10 cm ³ de prise	gr. hydrate de maltose formé	% hydrolysé	$V = \frac{X}{t \cdot E}$
	a	E	t		X		V
8	0,6	0,35	5	0,3	0,018	3	0,010
			10	0,6	0,036	6	0,010
			15	0,8	0,048	8	0,0091
			30	1,2	0,072	12	0,0068
9	1,6	0,256	5	0,6	0,036	2,25	0,028
			10	1,2	0,072	4,5	0,028
			15	1,8	0,108	6,75	0,028
			30	2,9	0,172	10,75	0,022
10	2,2	0,405	5	1	0,06	2,7	0,0296
			10	2	0,12	5,4	0,0296
			15	2,85	0,17	7,7	0,028
			30	3,35	0,20	9,5	0,16

Remarques: Pour les essais 8, 9, on a préparé une solution dans un ballon jaugé de 100 cm³ et on a fait des prises de 20 cm³ chaque fois.

Pour l'essai 10 on a préparé une solution dans un ballon jaugé de 50 cm³ et on a fait des prises de 10 cm³ chaque fois.

¹⁾ J. Biol. Chem. **38**, I, 81 (1919).

²⁾ Voir mémoire précédent.

Précipitation du lyo-glycogène et des protéines.

La précipitation de 100 cm³ de la solution de glycogène brute à 0,2 % par 500 cm³ d'alcool donne un précipité pesant après dessiccation 0,2603 gr. Après hydrolyse acide, l'analyse, d'après *Bertrand*, donne 0,194 gr. de glycogène.

Le précipité contient donc 74,6 % de glycogène et 25,4 % de protéines.

Action de la β -amylase sur le lyo-glycogène.

La solution à 0,2 % de glycogène a été concentrée et l'on a obtenu une solution à 0,9 % de glycogène après avoir précipité les protéines par l'acide tungstique: 100 cm³ de solution de glycogène sont débarassés des protéines par 20 cm³ d'une solution à 10 % de tungstate de sodium additionnée de 20 cm³ d'acide sulfurique 0,66-n. Par centrifugation, on sépare la solution de glycogène du précipité formé, on tamponne et on ajoute l'enzyme.

Essais N ^o	Conc. de glycogène en gr. pour 100 cm ³	Conc. d'enzyme en gr. pour 100 cm ³	Temps en min.	cm ³ KMnO ₄ 0,1-n.	gr. hydrate de maltose formé	% hydrolysé	$V = \frac{X}{t \cdot E}$
	a	E	t		X		V
11	0,6	0,384	5	1,2	0,072	12	0,0375

Remarques: L'observation n'a pu être menée plus loin, car la présence de l'acide tungstique à l'état colloïdal a comme effet d'oxyder le groupe aldéhydique du maltose formé, donc de fausser les résultats de l'analyse.

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