

die in den vier letzten Kolonnen angegebenen Daten. Man sieht daraus, dass wiederum auf das eine Al der Zwischenschicht rund 1 Cl kommt. Einzig bei den beiden aluminiumhydroxydreichsten Präparaten ist der Chloridgehalt auch hier etwas niedriger. Durch dieses Ergebnis an einem recht umfangreichen Material werden die oben gezogenen Schlüsse gut bestätigt. Der Wassergehalt ist ebenfalls stets kleiner als eins. (Präparat 16d bildet eine Ausnahme; es war offenbar zu wenig getrocknet).

Fasst man das Ergebnis aller analysierter Präparate zusammen, so ergibt sich, dass beim Hydroxysalz maximal rund 1/4 des Magnesiumhydroxyds der Hauptschichten durch Aluminiumhydroxyd ersetzt werden kann, was etwas weniger ist als beim Doppelhydroxyd. Es existiert eine kontinuierliche Mischungsreihe von diesem aluminiumhydroxydreichsten bis zum aluminiumhydroxydfreien Hydroxydoppelchlorid.

Die Tatsache, dass Mischungen von Magnesiumoxyd und Aluminiumchloridlösung nicht erhärten ist darauf zurückzuführen, dass das Hydroxydoppelchlorid wasserfrei krystallisiert.

Bern, Chemisches Institut der Universität, Anorg. Abteilung.

177. Recherches sur l'amidon XXVIII.

Le glycogène de levure natif

par R. Jeanloz.

(11 IX 44)

Comparativement aux glycogènes de provenance animale, ceux du foie et du muscle du lapin ou celui de moule, le glycogène extrait de la levure a été relativement peu étudié.

*Harden et Young*¹⁾ en 1902, puis en 1912, mettent au point une méthode d'extraction aqueuse après broyage mécanique de la levure et d'élimination des mannanes par le sulfate d'ammonium; ils comparent la coloration à l'iode, l'opalescence et le pouvoir rotatoire du glycogène qu'ils obtiennent avec le glycogène de provenance animale.

En 1925, *Ling, Nanji et Patton*²⁾ modifient la méthode d'extraction en traitant la levure par la soude caustique à 2% à chaud; ils introduisent l'élimination des mannanes par la liqueur de *Fehling*. L'étude du glycogène qu'ils obtiennent est reprise par *Daoud et Ling*³⁾ qui se basent, comme *Harden et Young*, sur la coloration à l'iode, l'opalescence et le pouvoir rotatoire; ils mentionnent, sans autre précision, que des recherches enzymatiques ont été effectuées, confirmant la similitude des glycogènes de levure et animal.

¹⁾ A. Harden et W. J. Young, Soc. **81**, 1224 (1902) et **101**, 1928 (1912).

²⁾ A. R. Ling, D. R. Nanji et F. J. Patton, J. Inst. Brew. **33**, 316 (1925) et Wschr. Brauerei **42**, 205 (1925), dans G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse II, 876 (1932).

³⁾ K. M. Daoud et A. R. Ling, J. Soc. Chem. Ind. Trans. **50**, 379 (1931).

La pureté de leur glycogène, extrait à la soude, est mise en doute par *Mc Anally* et *Smedley*¹⁾.

Stockhausen et *Silbereisen*²⁾ étudient les différentes extractions du glycogène de levure en vue de son dosage et introduisent l'élimination des protéines par le chloroforme selon *Sevag*; *Brandt*³⁾ indique une méthode de dosage sur la cellule par mesure photo-électrique de la coloration obtenue avec l'iode.

Le glycogène de levure est considéré pourtant comme « identique » au glycogène animal.

Il n'a été publié aucune donnée concernant son poids moléculaire, sa viscosité, sa dégradation ou ses dérivés. Dans l'état actuel des recherches dans le domaine des polysaccharides, il est évident que la coloration à l'iode, l'opalescence ou le pouvoir rotatoire ne peuvent servir de critère pour établir l'identité ou la similitude de deux polysaccharides.

La coloration à l'iode varie pour les glycogènes animaux selon leur provenance et l'on sait que des amidons, tel l'amidon de riz collant, peuvent présenter une coloration avec l'iode semblable à celle du glycogène, bien que leurs structures soient complètement différentes⁴⁾. Le pouvoir rotatoire est également très variable pour les différents glycogènes animaux; il varie de +188° à +207°⁵⁾ et ne peut servir de critère, de même que l'opalescence qui dépend, d'une part de la pureté du produit, d'autre part de son poids moléculaire et de sa solubilité, ainsi que nous l'avons mis en évidence pour le glycogène de moule⁶⁾.

Ce manque de preuve concernant la similitude des glycogènes de levure et de provenance animale, ainsi que l'importance du rôle du glycogène de levure dans la fermentation alcoolique nous ont amenés à l'étudier suivant le même schéma que nous avions suivi dans le cas du glycogène de moule⁶⁾.

Extraction et purification.

La principale difficulté de l'étude du glycogène de levure se trouve dans son extraction. Il est accompagné de divers polysaccharides, tels que le polyose isolé par *Zechmeister* et *Toth*⁷⁾, étudié en collaboration avec *Freudenberg* et *Plankenhorn*⁸⁾, puis par *Hassid*, *Joslyn* et *Mc Ready*⁹⁾, solubilisé par la soude caustique, et les man-

¹⁾ *R. A. Mc Anally* et *I. Smedley-Maclean*, *Biochem. J.* **31**, 72 (1937).

²⁾ *F. Stockhausen* et *K. Silbereisen*, *Bioch. Z.* **287**, 276 (1936).

³⁾ *K. M. Brandt*, *Protoplasma* **36**, 77 (1941).

⁴⁾ *K. H. Meyer* et *M. Fuld*, *Helv.* **24**, 1404 (1941).

⁵⁾ *W. S. Reich*, *C. r.* **195**, 1029 (1932); *W. N. Haworth*, *E. L. Hirst* et *F. A. Isherwood*, *Soc.* **1937**, 577; *H. Staudinger* et *E. Husemann*, *A.* **530**, 1 (1937).

⁶⁾ *K. H. Meyer* et *R. Jeanloz*, *Helv.* **26**, 1784 (1943).

⁷⁾ *L. Zechmeister* et *G. Toth*, *Bioch. Z.* **270**, 309 (1934).

⁸⁾ *K. Freudenberg* et *E. Plankenhorn*, *A.* **536**, 257 (1938).

⁹⁾ *W. Z. Hassid*, *M. A. Joslyn* et *R. M. Mc Ready*, *Am. Soc.* **63**, 295 (1941).

nanes, étudiés par *Haworth*, *Hirst* et *Isherwood*¹⁾, solubilisés par l'eau bouillante.

L'extraction par l'alcali fournit un glycogène mêlé d'acides nucléiques et de tout produit de décomposition chimique d'un glucoprotéide (« desmoglycogène » hypothétique de *Willstätter* et *Rohdewald*), mais exempt de protéines, alors que l'extraction par l'eau bouillante évite la mise en solution des acides nucléiques, mais n'élimine pas les protéines.

Les divers constituants de la paroi cellulaire étant très résistants aux agents chimiques d'une part, et comme nous voulions éviter, d'autre part, toute dégradation du glycogène, afin de l'obtenir à l'état natif, nous avons écarté les méthodes d'extraction à l'alcali et avons choisi l'extraction aqueuse après broyage mécanique de la levure en présence de sable fin, selon la méthode de *Harden* et *Young*. Nous n'avons pas pu constater par la méthode de *Pflüger* si tout le glycogène est solubilisé ou entraîné par l'eau, comme dans le cas du glycogène de moule, car il n'est pas possible d'effectuer le broyage total de toutes les cellules.

Les mannanes ont été précipités au moyen de leur combinaison avec la liqueur de *Fehling* selon *Ling*, *Nanji* et *Patton*, alors que les protéines étaient éliminées par l'acide picrique comme dans le cas du glycogène de moule.

Le glycogène obtenu a été purifié par électrodialyse; à partir de 500 gr. de levure comprimée, nous avons obtenu 1,250 gr. de glycogène. Ce dernier a été fractionné par électrodialyse en deux parties: une soluble et limpide (Fraction I) et une trouble, formant la couche inférieure (Fraction II).

Fraction I: 265 mgr. hydrosoluble.

Fraction II: 985 mgr., mélange de 70 mgr. soluble et 915 mgr. insoluble.

Le glycogène de levure étudié contient donc environ 27 % de glycogène soluble et 73 % d'insoluble.

Nature du glycogène de levure.

Ses différentes propriétés, ainsi que celles de son dérivé acétylé, mettent en évidence sa similitude avec le glycogène de provenance animale, ainsi que le montre le tableau suivant p. 1504.

Les solubilités, le comportement à l'électrodialyse ainsi que les colorations à l'iode sont identiques. Les opalescences présentent le même phénomène dans le cas des deux glycogènes: la fraction soluble est limpide et faiblement opalescente, alors que la fraction « insoluble » donne une suspension trouble.

La teneur en azote indique qu'également dans le cas du glycogène de levure il n'y a pas de liaison chimique avec les protéines.

¹⁾ *W. N. Haworth, E. L. Hirst et F. A. Isherwood, Soc. 1937, 784.*

La solubilité ou l'insolubilité n'est donc pas causée par une liaison entre le glycogène ou les protéines comme l'admettent *Willstätter* et *Rhodewald*¹⁾.

	Glycogène de moule	Glycogène de levure
Fraction soluble de nos spécimens . . .	30%	27%
Fraction insoluble de nos spécimens . . .	70%	73%
Coloration avec l'iode	brun-acaïjou	brun-acaïjou
Cendres	0,10%	0,19%
Azote	0,07% à 0,43%	0,13%
Phosphore	0,001%	0,084% (0,19% en P ₂ O ₅)
Pouvoir rotatoire (dans l'eau)	+192°	+187°
Dégradation par la β -amylase	32 à 43%	46 à 48%
Viscosité limite des acétates $\left(\frac{\eta_{spéc.}}{c = 0}\right)$	0,087 à 0,164	0,1155
Pouvoir rotatoire des acétates:		
dans l'alcool benzylique	+116° à +120°	+114°
dans le chloroforme	+143°	+141°

Les teneurs en phosphore présentent par contre une nette divergence. Toutes les cendres étant constituées par des phosphates, nous retrouvons dans ce cas la même différence qui existe entre l'amylopectine de maïs et celle de pomme de terre, cette dernière étant semblable à la première, mais phosphorylée en position 6²⁾.

Le glycogène de levure possède également quelques restes de glucose phosphorylés alors que le glycogène de moule est exempt de phosphore; il reste à établir la nature et la position de cette estérification.

La dégradation par la β -amylase, légèrement supérieure à celle du glycogène de moule natif, reste dans la limite des dégradations des glycogènes de provenance animale par ce ferment (glycogène commercial: 46 à 46,5 %). Ainsi que nous l'avions supposé précédemment, cette dégradation supérieure s'explique par une disposition plus lâche, moins compacte, des ramifications dans la molécule du glycogène de levure que dans celle de moule, permettant une meilleure pénétration de l'enzyme.

La viscosité du triacétate indique également une forme compacte de la molécule, ainsi qu'un poids moléculaire de même ordre que celui du glycogène de moule, soit supérieur à 6×10^6 (fig. 1, p. 1506).

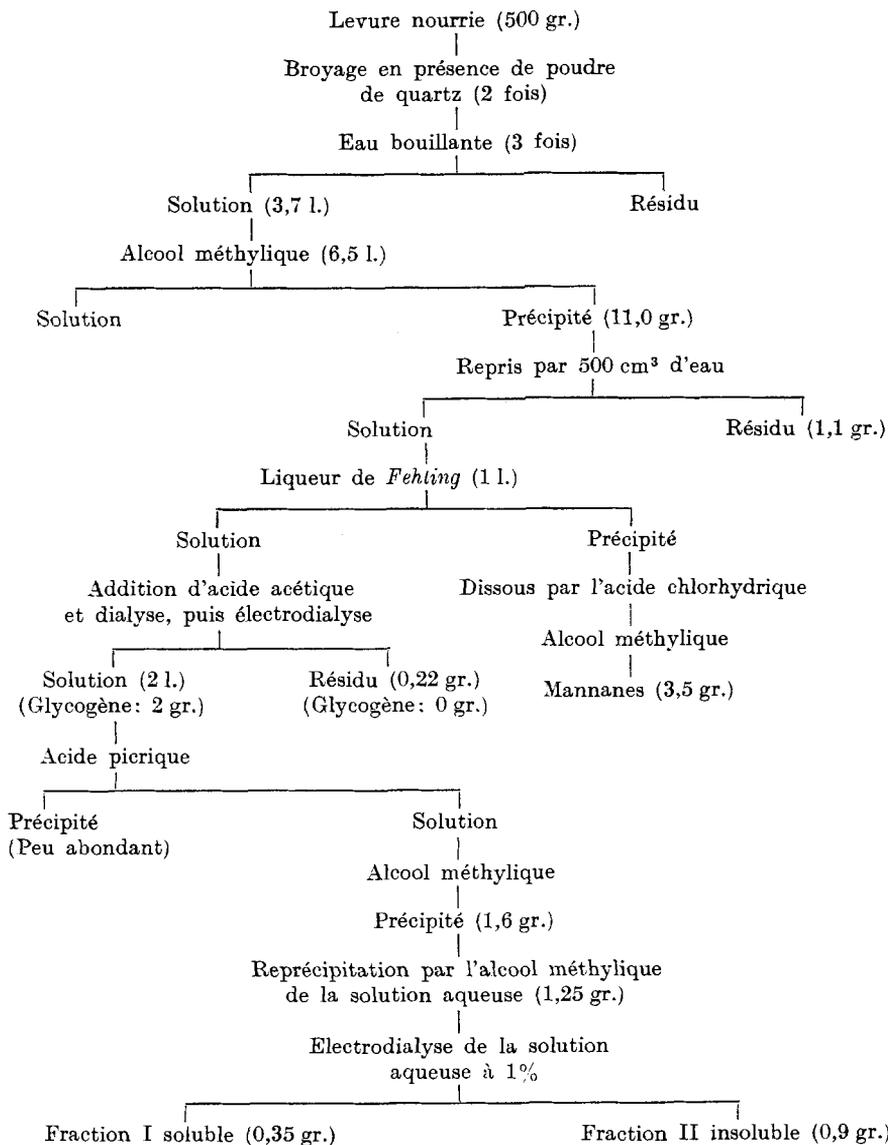
Ce travail a été effectué grâce à une bourse accordée par la *Fondation pour bourses en biologie et en médecine*, que je tiens à remercier ici vivement.

¹⁾ *R. Willstätter* et *M. Rhodewald*, *Z. physiol. Ch.* **225**, 103 (1934).

²⁾ *K. H. Meyer*, *M. Wertheim* et *P. Bernfeld*, *Helv.* **24**, 378 (1941); *Th. Posternak*, *Helv.* **18**, 1351 (1935).

Partie expérimentale.

1. Schéma d'extraction, de purification et de fractionnement.



La teneur en eau varie entre 8 et 10% pour toutes les fractions. Les résultats des analyses sont donnés par rapport à la substance sèche. Les analyses sont effectuées selon les méthodes décrites précédemment¹⁾.

¹⁾ Helv. 26, 1784 (1943).

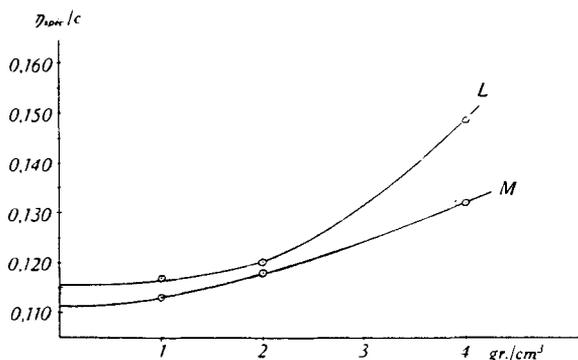


Fig. 1.

Viscosités des triacétates des fractions II du glycogène de moule (M) et du glycogène de levure (L).

2. Extraction aqueuse de glycogène brut.

Un kilogramme de levure de boulangerie de la « Fabrique de levure S.A., Oltten » est dilué dans 3½ litres d'eau et additionné de 500 gr. de saccharose et de quelques gouttes d'alcool décylrique pour empêcher la formation de mousses. On laisse 16 heures à température ordinaire, puis interrompt la fermentation en portant à l'ébullition pendant une demi-heure. On laisse refroidir la levure ainsi nourrie et la centrifuge. On lave à l'eau, puis presse; on obtient 500 gr. de levure.

Cette levure est introduite dans un moulin à barres d'acier avec 500 gr. de quartz en poudre, 100 gr. de kieselgur et 200 cm³ d'eau. Le poids des barres d'acier est de cinq kilogrammes au minimum, leur longueur de 30 cm. On broye pendant 3 heures.

La pâte est alors diluée à 3 litres et portée à l'ébullition pendant une demi-heure. On centrifuge et filtre après refroidissement; on obtient ainsi 1,3 litres d'une solution jaune, de p_H 5,7, présentant une forte réaction avec l'iode. Le glycogène brut est alors précipité par addition de 2,5 litres d'alcool méthylique à 98%. On lave plusieurs fois à l'alcool méthylique, puis à l'éther, sèche au dessiccateur à vide et obtient 6,5 gr. de glycogène brut.

Le résidu du broyage est traité une nouvelle fois au moulin à barres. L'extraction aqueuse à l'ébullition est effectuée pendant deux heures. On obtient alors 3,8 gr. de glycogène brut. Une troisième extraction dans les mêmes conditions fournit 0,7 gr.

Poids total du glycogène brut obtenu: 11,0 gr.

3. Elimination des mannanes par la liqueur de Fehling.

Méthode décrite par Ling, Nanji et Patton¹⁾.

11 gr. de glycogène brut sont dissous dans 500 cm³ d'eau. On centrifuge et filtre le résidu insoluble, pesant 1,1 gr. La solution est additionnée d'un litre de liqueur de Fehling, fraîchement préparée, et laissée 48 heures à la glacière, puis on centrifuge.

Le précipité est lavé par 100 cm³ de soude caustique à 2%, puis par l'eau distillée et dissous dans 120 cm³ d'acide chlorhydrique 1-N à froid; on reprécipite immédiatement par 300 cm³ d'alcool méthylique, lave à l'alcool méthylique, puis à l'éther et sèche au dessiccateur à vide. On obtient ainsi 3,5 gr. de mannanes.

La liqueur de centrifugation est additionnée de 120 cm³ d'acide acétique glacial et de quelques gouttes de toluène et mise à dialyser contre l'eau distillée à 0°. Au bout d'une semaine, après avoir renouvelé plusieurs fois l'eau distillée, on électrodialyse dans

¹⁾ A. R. Ling, D. R. Nanji et F. J. Patton, l. c.

l'appareil décrit précédemment¹⁾, en agitant, sous 220 V. Les dernières traces de cuivre disparaissent après 3 jours de ce traitement.

La solution d'un volume de 2 litres est centrifugée et laisse un résidu brunâtre, pesant 0,22 gr., ne donnant pas de coloration avec l'iode. Elle contient 1,8 gr. de glycogène.

Teneur en glycogène: 10 cm³ de solution emploient, après hydrolyse, 3,20 cm³ KMnO₄ 0,1-N: 10,0 mgr. glucose; 9,0 mgr. glycogène.

4. *Élimination des protéines par l'acide picrique.*

La solution est additionnée à froid, sous forte agitation, de 800 cm³ d'une solution d'acide picrique à 1,5%. On laisse une nuit à la glacière, centrifuge, puis filtre un précipité peu abondant.

La solution est additionnée sous agitation violente de 5,2 litres d'alcool méthylique. Le précipité est centrifugé, lavé 3 fois par 100 cm³ d'alcool méthylique et redissous dans 100 cm³ d'eau distillée. On précipite à nouveau sous agitation au moyen de 200 cm³ d'alcool méthylique et de un cm³ d'acétate de sodium 1-N. On obtient, après centrifugation et lavages répétés à l'alcool méthylique et à l'éther 1,6 gr. de glycogène. Ce dernier est purifié par dissolution dans 100 cm³ d'eau et électrodialyse sous agitation de cette solution sous 200 V jusqu'à un ampérage de 3 MA. On le reprécipite avec 400 cm³ d'alcool méthylique et 0,1 cm³ d'acétate de sodium 1-N. Après centrifugation et lavages comme décrit précédemment, on obtient 1,25 gr. d'un produit blanc neigeux.

Analyses: Cendres 0,19%

Phosphore: 0,084% (P₂O₅ 0,19%)

Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Kjeldahl*) env. 1%

38,30 mgr. subst. emploient 0,350 cm³ HCl 0,01-N; 0,13% N.

5. *Fractionnement du glycogène brut par électrodialyse.*

705 mgr. de glycogène brut sont dissous dans 75 cm³ d'eau distillée. On les introduit dans l'électrodialyseur de *Pauli* décrit précédemment, possédant un compartiment central de 1 cm. de longueur. L'électrodialyse dure 5 jours sous une tension de 120 V jusqu'à un ampérage de 3,0 MA. On sépare alors par siphonage deux couches. La couche supérieure (Fraction I) possède une faible opalescence et contient 150 mgr. de glycogène soluble dans 59 cm³. La couche inférieure (Fraction II), très opalescente, contient 555 mgr. de glycogène dans 16 cm³, ce qui correspond environ à un mélange de 40 mgr. de glycogène soluble avec 515 mgr. de glycogène insoluble.

6. *Pouvoirs rotatoires.*

Fraction I du glycogène de levure.

$\alpha_D^{19} = +0,88^\circ (\pm 0,05^\circ)$; $c = 0,235\%$ dans l'eau; $l = 2$ dm.; $[\alpha]_D^{19} = +187^\circ (\pm 6^\circ)$

Fraction I du glycogène de moule (préparé selon nos indications précédentes¹⁾).

$\alpha_D^{19} = +4,06^\circ (\pm 0,1^\circ)$; $c = 2,12\%$ dans l'eau; $l = 1$ dm. $[\alpha]_D^{19} = +192^\circ (\pm 6^\circ)$

7. *Dégradation des fractions I et II par la β -amylase.*

L'enzyme est préparée selon nos indications précédentes²⁾.

Activité: 1 mgr. d'enzyme libère en 10 minutes à 35° 15,3 mgr. de maltose hydraté d'une solution d'amidon de *Zulkowsky* à 1%.

La solubilisation du glycogène, la teneur en enzyme et les rajeunissements sont effectués de la manière décrite dans notre travail précédent¹⁾.

¹⁾ Helv. **26**, 1784 (1943).

²⁾ Helv. **23**, 1465 (1940).

Teneur en glyco- gène, calculée en glucose en gr./100 cm ³	Temps en heures	Prise en cm ³	cm ³ KMnO 0,1-N	Maltose hydraté en gr./100 cm ³	% hydrolyse
Fraction I 0,208	30	10	1,60	0,096	45
			« Rajeunissement »		
	54	10	0,85	0,102	49
	74	10	0,82	0,098	47
	96	20	1,70	0,101	48,5
Fraction II 0,450	20	10	3,25	0,196	43,5
	40	10	3,25	0,196	43,5
			« Rajeunissement »		
	60	10	1,85	0,214	47,5
	90	20	3,55	0,207	46

8. Acétate de la fraction II.

L'acétylation est effectuée comme pour la fraction II du glycogène de moule. A partir de 330 mgr. de glycogène, on obtient 450 mgr. d'acétate, de couleur gris-clair. On purifie par dissolution dans l'alcool benzylique et précipitation par l'alcool éthylique.

Si on laisse une solution dans l'alcool benzylique, colorée en brun par les impuretés dues à l'acétylation, à la lumière du jour pendant quelques semaines, il se produit une décoloration totale de la solution, ce qui permet de mesurer les pouvoirs rotatoires, de précipiter un acétate blanc ou d'obtenir un produit transparent par évaporation.

Teneur en groupes acétyles:

2,955 mgr. emploient 3,06 cm³ NaOH 0,01-N: 44,55% —COCH₃.

Calculé pour dérivé triacétylé: 44,80% —COCH₃.

Viscosités.

Les mesures sont effectuées en solution de tétrachloro-éthane dans le viscosimètre d'Ostwald, à 25,0°.

c en gr./100 cm ³	η_{rel}	$\eta_{spéc.}$	$\eta_{spéc.}/c$
4	1,586	0,586	0,1485
2	1,240	0,240	0,120
1	1,117	0,117	0,117
0 extrapolé (par voie graphique)			0,1155

Pouvoirs rotatoires des acétates.

Solution dans l'alcool benzylique.

Glycogène de levure:

$$\alpha_D^{20} = +2,97^\circ (\pm 0,05^\circ); c = 2,60\%; l = 1 \text{ dm.}; [\alpha]_D^{20} = +114^\circ (\pm 5^\circ)$$

Glycogène de moule (Fraction I):

$$\alpha_D^{20} = +12,1^\circ (\pm 0,5^\circ); c = 10,10\%; l = 1 \text{ dm.}; [\alpha]_D^{20} = +120^\circ (\pm 5^\circ)$$

Glycogène de moule (Fraction II):

$$\alpha_D^{20} = +13,1^\circ (\pm 0,5^\circ); c = 11,25\%; l = 1 \text{ dm.}; [\alpha]_D^{20} = +116^\circ (\pm 5^\circ)$$

Solution dans le chloroforme.

Glycogène de levure:

$$\alpha_D^{23} = +3,50^\circ (\pm 0,2^\circ); c = 2,48\%; l = 1 \text{ dm.}; [\alpha]_D^{23} = +141^\circ (\pm 5^\circ)$$

Glycogène de moule (Fraction I).

$$\alpha_D^{23} = +4,75^\circ (\pm 0,1^\circ); c = 3,32\%; l = 1 \text{ dm.}; [\alpha]_D^{23} = +143^\circ (\pm 3^\circ)$$

Glycogène de moule (Fraction II):

$$\alpha_D^{23} = +6,10^\circ (\pm 0,1^\circ); c = 4,28\%; l = 1 \text{ dm.}; [\alpha]_D^{23} = +143^\circ (\pm 3^\circ)$$

Ce travail a été entrepris sur les conseils de M. le Professeur *K. H. Meyer*; je le remercie vivement pour l'intérêt qu'il lui a porté.

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

178. Recherches sur l'amidon XXIX.

Dosages des sucres méthylés avec groupe alcoolique primaire libre

par R. Jeanloz.

(11 IX 44)

Les polysaccharides peuvent être groupés en polysaccharides non ramifiés, tels que la cellulose et l'amylose, et ramifiés, tels que l'amylopectine et le glycogène. La méthode dite « des groupes terminaux » élaborée par *Haworth* et ses collaborateurs permet de calculer le nombre des ramifications, en dosant le 2,3,4,6-tétraméthyl-glucose obtenu par scission du polysaccharide complètement méthylé. La détermination des points de ramification nécessite la scission complète du polysaccharide méthylé et l'analyse quantitative des sucres méthylés ainsi obtenus.

Si toutes les ramifications prennent naissance en position 6, on doit obtenir une quantité de 2,3-diméthyl-glucose correspondant au 2,3,4,6-tétraméthyl-glucose obtenu dans le dosage des groupes terminaux. Afin de vérifier cette hypothèse, émise pour la structure de l'amylopectine et du glycogène, nous avons mis au point le dosage du 2,3-diméthyl-glucose.

Différentes méthodes ont déjà été essayées et publiées sur ce dosage, sans résultats ou avec une approximation quantitative insuffisante.

Ainsi, *Bell*¹⁾ calcule la teneur en diméthyl-glucose d'un mélange de méthylglucoses obtenu par scission du glycogène méthylé, au moyen de l'indice de réfraction et de la teneur en méthoxy du résidu de distillation de la méthode des groupes terminaux.

Hassid et *Dore*²⁾ ne font que mesurer la teneur en méthoxy pour déterminer la quantité de diméthyl-glucose des produits d'hydrolyse de l'amidon méthylé.

¹⁾ *D. J. Bell*, *Biochem. J.* **31**, 1683 (1937).

²⁾ *W. Z. Hassid* et *W. H. Dore*, *Am. Soc.* **59**, 1503 (1937).