

97. Recherches sur l'amidon. XXVII.

Prescription pour la préparation de glucose-1-phosphate

par P. Bernfeld, Cl. de Traz et Ch. Gautier.

(1 IV 44)

Après avoir préparé plusieurs fois du glucose-1-phosphate par phosphorolyse enzymatique de l'amidon d'après *Cori*¹), *Kiessling*²) et *Hanes*³), nous croyons utile de rapporter la prescription détaillée que nous utilisons maintenant. Elle se distingue dans quelques détails des méthodes déjà décrites et s'est montrée à la portée de tout le monde.

Solution de phosphorylase.

1,5 kg. de pommes de terre pelées, passées dans la machine à hacher et centrifugées, donnent 450 cm³ de jus brun. Le jus est additionné lentement et sous agitation à 0° de 320 cm³ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium, ajustée au pH 6,8 par quelques gouttes d'ammoniaque. On centrifuge; le précipité est jeté. On ajoute 320 cm³ de la solution de sulfate d'ammonium; le précipité est recueilli par centrifugation et redissous dans 100 cm³ d'eau distillée froide et dialysé 24 heures dans un tube de cellophane contre l'eau courante (température au maximum 5° C.). Le précipité formé lors de la dialyse est éliminé par centrifugation, et jeté. La solution se conserve au frigidaire pendant plusieurs jours.

L'activité de l'enzyme est contrôlée d'après la méthode décrite dans le travail précédent⁴); 1 cm³ de la solution libère 1,35 mgr. de phosphore.

Solution de phosphate potassique de pH 6,9. On dissout à chaud 124,5 gr. de KH_2PO_4 *Merck* puriss. (0,915 mol.-gr.) dans 400 cm³ d'eau et on y ajoute la solution de 34,2 gr. (0,610 mol./gr.) de KOH dans 100 cm³ d'eau distillée. On refroidit à 0° C., et on contrôle le pH.

Préparation de l'empois d'amidon 4% et phosphorolyse.

80 gr. de fécale de pommes de terre sont suspendus dans 100 cm³ d'eau froide et introduits dans 3,5 litres d'eau de 90° sous forte agitation. On maintient la température à 90° pendant 10 minutes sous agitation. Après refroidissement à 55° exactement on ajoute une solution filtrée et dialysée de 800 mgr. de *Fermasol Standard*⁵) dans 100 cm³ d'eau. On maintient la température à 55° pendant environ 10 minutes. La viscosité baisse très fortement, mais la réaction bleue à l'iode persiste. Cette dégradation supprime la cristallisation (« rétrogradation ») de l'amylase et facilite la phosphorolyse.

On désactive alors l'amylase en chauffant rapidement jusqu'à 90°, refroidit et mélange à température ordinaire cet empois, la solution-tampon de phosphates, la solution d'enzyme et une solution de 2,5 gr. de fluorure de potassium dans 10 cm³ d'eau (pour inhiber les phosphatases). On abandonne le tout pendant 24 heures à la température ordinaire, après avoir ajouté quelques gouttes de toluène.

On suit la disparition de P libre par la méthode de *King* en le dosant au début et après 24 heures; la moyenne de nos résultats était: 28,4 gr. de P libre avant et 22,5 gr. de P libre après la réaction (rapporté au total).

¹) *C. F. Cori et G. T. Cori*, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. (Am.) **34**, 702 (1936).

²) *W. Kiessling*, Bioch. Z. **298**, 421 (1938).

³) *C. S. Hanes*, Proc. Roy. Soc. [B] **128**, 421 (1939).

⁴) *K. H. Meyer et Cl. de Traz*, Helv. **27**, 840 (1944).

⁵) *Fermasol Standard* de la « *Schweiz. Ferment A.-G.*, Bâle » est un produit commercial d'amylase de pancréas contenant des sels.

Désactivation de la phosphorylase, élimination des phosphates et de l'amidon.

On alcalinise par NH_4OH jusqu'au pH 8,5 et chauffe rapidement par portions de 500 cm^3 à 85°C . (Il faut en tout $36,5 \text{ cm}^3 \text{ NH}_4\text{OH}$ à 14%, puis encore 3 cm^3 pendant la chauffe pour maintenir le pH à 8,5). On maintient la température pendant 5 minutes à 85° , on refroidit rapidement et on réunit le tout.

On contrôle la disparition de l'activité: sur un échantillon, on précipite les phosphates par de l'acétate de magnésium en milieu ammoniacal au pH 8,5, on neutralise au pH 6,8 et on conserve la solution pendant 24 heures. Si la teneur en P lié n'a pas diminué, la phosphorylase a bien été désactivée.

On ajoute alors d'acétate de magnésium en solution aqueuse par petites portions (en vérifiant chaque fois avec un indicateur approprié (papier Lyphan) que le pH ne tombe pas au-dessous de 8,5) jusqu'à ce que tous les phosphates aient été précipités (16—17 gr. Mg^{++}). On lave le précipité de phosphates 2 fois avec 300 cm^3 d'eau légèrement ammoniaque. On dose le P libre (il doit être 0) et le P total (après hydrolyse dans de l'acide perchlorique n. pendant 15 minutes à 100°). Nous trouvons 3,35 gr. de P correspondant à 40 gr. de $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{--O--PO}_3\text{K}_2$, 2 H_2O .

La solution est concentrée dans le vide à $\frac{1}{4}$ de son volume. Pour éviter une hydrolyse de l'ester par une action trop prolongée de la température élevée, on évapore en petites portions (500 cm^3) dans un bain d'eau ne dépassant pas 35° . Par suite du départ de l'ammoniac un pH de 5,5—6,5 s'établit. On ajoute alors une solution aqueuse filtrée et dialysée de 4 gr. de « Fermasol Standard » dans 100 cm^3 d'eau et abandonne pendant 24 heures.

Précipitation du sel de baryum de l'ester.

On ajoute un excès de 10% (par rapport à la quantité calculée d'après la teneur en P) de $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Ba, H}_2\text{O}$ en solution aqueuse à 30% (env. 100 cm^3). On introduit alors en mince filet et sous forte agitation du méthanol pur (7 vol. pour 4 vol. de la solution); on centrifuge, on lave le précipité 3 fois au méthanol dilué (7 méth. + 4 H_2O). Le précipité est dissous dans 400 cm^3 d'eau, le résidu épuisé 3 fois avec 50 cm^3 d'eau est jeté. On dose la teneur en Ba et en P; les dosages doivent concorder. (Nous trouvons au total 2,5 gr. P et 11 gr. Ba.)

Préparation du sel potassique.

La quantité de K_2SO_4 exactement calculée pour précipiter le Ba^{++} est dissoute et ajoutée lentement à température ordinaire sous forte agitation. On centrifuge, lave le précipité, et contrôle l'absence de Ba^{++} et de SO_4^{--} .

On concentre dans le vide jusqu'à environ 350 cm^3 en observant les mêmes précautions que la première fois.

Le sel potassique de l'ester est alors précipité très lentement et sous agitation par 4 volumes d'acétone pour 1 volume de solution. Le produit brut ainsi obtenu est filtré, lavé à l'acétone à 80%, séché dans le vide et chauffé dans un ballon dans le vide de la trompe à eau pendant 15 minutes à 70°C . pour désactiver des traces d' α -amylase. Rendement: environ 30 gr.

Le produit brut est dissous dans 200 cm^3 d'eau à 35° et agité pendant 5 minutes avec du charbon actif (3 gr.) lavé préalablement à l'eau distillée. On filtre et on obtient une solution tout à fait limpide colorée en jaune pâle. On concentre dans le vide à 35° et sous 10 mm. Hg dans un ballon à col large de 500 cm^3 jusqu'à ce que des cristaux commencent à se déposer sur les parois du ballon. On interrompt la concentration et on ajoute avec précaution et goutte à goutte de l'acétone jusqu'au léger trouble persistant et on laisse reposer une nuit à la glacière. Les cristaux parfaitement blancs sont filtrés, lavés à l'acétone, puis à l'éther, et séchés à l'air. (Rendement 14,5 gr.) Les eaux-mères sont évaporées jusqu'au début de cristallisation, additionnées d'acétone jusqu'à persistance du trouble et laissées une nuit à la glacière (4,5 gr.). Si on traite les deuxièmes eaux-mères de la même façon, on obtient encore quelques cristaux moins purs.