

22. Recherches sur l'amidon XXXVIII¹⁾.

Méthode perfectionnée de dégradation β -amylatique de l'amylose et de l'amyopectine

par P. Bernfeld et P. Gütler.

(10 XII 47)

Comme on l'a décrit à plusieurs reprises, la dégradation de l'amylose en maltose par la β -amylase est enravée par un changement de l'état de dissolution de l'amylose: le vieillissement. Il y a formation d'associations, puis de submicrons d'amylose qui ne sont plus attaqués par la β -amylase et qui se séparent finalement à l'état de particules visibles. La partie de l'amylose ainsi soustraite à l'action de l'enzyme est de nouveau rendue accessible à l'action de cette dernière par le «rajeunissement», opération qui consiste en une alcalinisation suivie de neutralisation.

Mais, dans le cas d'amyloses d'un degré de polymérisation élevé, même plusieurs rajeunissements successifs ne permettent point d'achever la dégradation (voir fig. 1), la tendance de ces amyloses à la formation de submicrons étant trop forte. Ce phénomène peut facilement conduire à des conclusions erronées, en donnant au polysaccharide l'apparence de contenir de l'amyopectine.

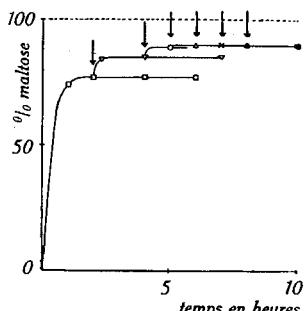


Fig. 1.

Adjonction de l'enzyme en excès à la solution d'amylose tamponnée préalablement. Chaque flèche indique un rajeunissement.

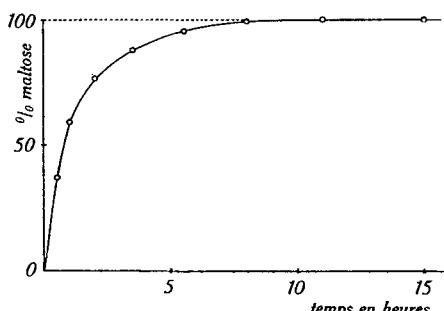


Fig. 2.

Adjonction de la solution alcaline d'amylose à la solution tamponnée d'enzyme en excès.

Nous avons mis au point une méthode qui supprime le vieillissement de l'amylose et permet sa dégradation totale (voir fig. 2). On

¹⁾ XXXVII, Helv. 31, 103 (1948).

fait couler goutte à goutte la solution alcaline d'amylose dans une solution de β -amylase en grand excès, tamponnée à p_H 4,8. L'amylose se trouve en dispersion moléculaire au moment de la neutralisation. Il est alors entouré d'un tel excès d'enzyme que la formation du complexe enzyme-substratum est infiniment plus probable que l'association de plusieurs molécules d'amylose entre elles; le complexe amylose- β -amylase ne subit pas le vieillissement si bien que l'amylose ne peut plus échapper à l'hydrolyse.

Traitée par cette méthode, l'amylopectine fournit une dextrine résiduelle, tout comme pour l'ancien procédé. Cependant, les valeurs limite de dégradation obtenues ainsi sont plus élevées¹⁾. Ceci montre que l'amylopectine subit également le phénomène du vieillissement.

Description de la méthode.

Solutions:

1. Tampon p_H 4,8: 10,2 cm³ de CH₃COOH et 30,7 gr. de CH₃COONa, 3 H₂O sont dissous dans de l'eau et portés à 250 cm³.

2. 1 gr. d'acide dinitro-3,5-salicylique, 20 cm³ de NaOH 2 n et 30 gr. de sel de Seignette sont portés à 100 cm³.

3. Solution de β -amylase. 500 gr. de farine de blé sont agités à 20° avec 3000 cm³ d'eau. Après 6 heures, on centrifuge 10 minutes à 3000 tours/min., décante la solution limpide (2500 cm³), concentre à 300 cm³ en petites portions à 30° et refroidit à 0°. Pour la désactivation de l' α -amylase, on ajoute lentement et sous faible agitation 75 cm³ d'acide acétique n, porté préalablement à 0°, et on laisse cette solution pendant 6 jours à +3°. Puis on y dissout 20 gr. d'acétate de sodium crist., ce qui ramène le p_H à 4,8. On centrifuge et rejette le précipité. La β -amylase est alors précipitée de la solution par adjonction de 900 cm³ de méthanol à 0° sous faible agitation. On centrifuge, lave le précipité par du méthanol à 70%, puis par du méthanol pur, et finalement par de l'éther. Le produit est séché au vide. On redissout cette poudre dans 320 cm³ d'eau et centrifuge la solution pour éliminer une faible quantité de substance insoluble. Cette solution est exempte d' α -amylase puisqu'elle n'attaque pas la dextrine résiduelle²⁾. Elle est stable à 0°. Activité²⁾: 1 cm³ de la solution diluée 1 à 20 donne 1,1 mgr. de maltose en 3 minutes à 20°.

4. Solution d'amylose ou d'amylopectine. Une quantité d'environ 100 mgr. d'amylose ou de 200 mgr. d'amylopectine ou d'amidon est triturée avec quelques gouttes d'eau, puis dissoute par adjonction de 5,0 cm³ de NaOH 2 n., éventuellement en chauffant légèrement. La solution est diluée à 200 cm³. Sa teneur exacte en polysaccharides est déterminée dans une prise aliquote par un dosage du glucose après hydrolyse acide à chaud.

Mode opératoire:

Dans un becher de 150 cm³, on mélange 4 cm³ de la solution de tampon (**1**), 1 cm³ de la solution de β -amylase (**3**) et 15 cm³ d'eau. A 35°, on introduit par une burette et sous bonne agitation 34,0 cm³ de la solution de substratum (**4**) à raison de 20 à 30 gouttes par minute. Le p_H monte à 5,3 au cours de cette opération. L'emploi de quelques gouttes d'alcool décylique ou d'un corps semblable doit être évité, car il précipite et désactive partiellement la β -amylase.

L'enzyme possède un faible pouvoir réducteur qui peut légèrement augmenter dans les conditions de l'essai: pour cette raison, on effectue un essai à blanc en mélangeant à 35° 4 cm³ de **1**, 0,85 cm³ de NaOH 2 n, 1 cm³ de **3**. On complète à 54 cm³ et on garde à 35°.

¹⁾ à publier.

²⁾ Voir G. Noëting et P. Bernfeld, Helv. 31, 286 (1948).

A des intervalles déterminés, on prélève des prises de 2 cm³ de chacune de ces solutions. On ajoute 2 cm³ de **2**, plonge 5 minutes dans de l'eau bouillante, refroidit, dilue par addition de 20 cm³ d'eau et détermine l'extinction au photomètre. La différence entre l'extinction de l'essai de dégradation et l'extinction de l'essai à blanc est calculée en mgr. de maltose d'après une courbe d'étalonnage.

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

23. Recherches sur l'amidon XXXIX¹⁾.

L'amylose de maïs

par **Kurt H. Meyer, P. Bernfeld, P. Gütler et G. Noëting.**

(10 XII 47)

Comme nous l'avons montré il y a quelques années²⁾, l'amidon de maïs ainsi que la plupart des autres espèces d'amidon sont composés de deux polysaccharides ou mieux de deux types de polysaccharides: un polyglucosane non ramifié, pour lequel nous avons proposé de reprendre le nom d'«amylose», et un deuxième à structure ramifiée, l'«amylopectine». Mise en doute par Haworth³⁾, cette constatation a été confirmée par Hassid et McCready⁴⁾ et par d'autres auteurs.

Notre méthode d'alors consistait à extraire l'amylose des grains par l'eau chaude; 7—10% de l'amidon passent en solution et se révèlent comme de l'amylose pur; l'amylopectine reste dans les grains gonflés. Plus tard, nous avons affirmé qu'une séparation totale n'est pas possible avec cette méthode⁵⁾; d'autres auteurs, en particulier Kerr⁶⁾, sont d'avis qu'une partie considérable de l'amylose reste avec l'amylopectine dans les grains gonflés.

Indépendamment de nous, Schoch⁷⁾ décrit une nouvelle méthode de fractionnement de l'amidon: l'amidon dégraissé est traité à l'eau sous pression à 109°. Les grains sont alors complètement désintégrés et donnent une solution homogène. L'addition de butanol ou de pentasol — mélange commercial d'alcools aliphatiques — provoque la précipitation d'environ 20% de l'amidon; cette fraction est appelée par Schoch la fraction A. Elle ressemble à l'amylose, tandis que le

¹⁾ XXXVIII, Helv. **31**, 106 (1948).

²⁾ K. H. Meyer, W. Brentano et P. Bernfeld, Helv. **23**, 845 (1940).

³⁾ W. N. Haworth, R. L. Heath et S. Peat, Soc. **1942**, 55.

⁴⁾ W. Z. Hassid et R. M. McCready, Am. Soc. **65**, 1157 (1943).

⁵⁾ K. H. Meyer et P. Heinrich, Helv. **25**, 1639 (1942).

⁶⁾ R. W. Kerr, Chemistry and Industry of Starch, New-York 1944, page 129.

⁷⁾ Th. J. Schoch, Cereal Chemistry **18**, 121 (1941); Am. Soc. **64**, 2957 (1942).