

La solution d'amylopectine est concentrée au vide, on la filtre ensuite à travers une colonne de chromatographie, remplie de 25 gr. de coton hydrophile. Cette opération est répétée 2—3 fois avec un nouveau remplissage de coton. On précipite ensuite l'amylopectine de la solution par un excès de méthanol et on centrifuge. Le culot est lavé 2 fois au méthanol et 2 fois à l'éther. Produit sec: 36,5 gr. d'amylopectine, soit 73% par rapport à l'amidon total.

RÉSUMÉ.

En combinant la méthode de séparation des constituants de l'amidon indiquée par *Schoch* avec la méthode employée par *Meyer* et *Bernfeld*, on arrive à une meilleure séparation. Les fractions de l'amidon de pomme de terre ont été étudiées. Leurs poids moléculaires diffèrent considérablement de ceux de l'amidon de maïs. La différence entre le comportement des empois des deux espèces d'amidon est due en partie à la différence des poids moléculaires des amyloses respectifs.

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

204. Recherches sur l'amidon, 41¹⁾.

La dégradation de l'amylopectine par la β -amylase

par Kurt H. Meyer, P. Bernfeld, P. Rathgeb et P. Gürtler.

(29 VII 48)

Nous avons décrit récemment une nouvelle méthode²⁾ de dégradation des composants de l'amidon par la β -amylase: on introduit une solution alcaline des polysaccharides dans une solution tamponnée de β -amylase en grand excès. Le phénomène de vieillissement qui entrave la dégradation est ainsi supprimé.

L'application de cette méthode à l'amylopectine nous a permis de déterminer exactement la vraie limite de sa dégradation. La dégradation exécutée de cette manière est plus rapide et plus poussée que celle que l'on observe d'après la prescription habituelle (adjonction d'une certaine quantité d'enzyme à une solution de polysaccharide). Par cette nouvelle méthode, un palier rigoureusement horizontal est atteint, tandis que dans la méthode habituelle, la dégradation continue lentement après avoir atteint un palier apparent. Cette dégradation lente s'explique par l'attaque beaucoup moins rapide des régions cristallines formées par le vieillissement.

Si une amylopectine contient de l'amylose, la valeur limite de dégradation devient trop grande, car l'amylose est dégradé à 100 % (voir fig. 2). Nous avons donc dû éliminer de nos préparations toute trace d'amylose, c'est-à-dire toute trace de substance donnant une

¹⁾ 40e communication: Helv. 31, 1533 (1948).

²⁾ P. Bernfeld et P. Gürtler, Helv. 31, 106 (1948).

couleur bleue avec l'iode. L'électrodécantation introduite par Samec pour la précipitation de l'amylopectine ne se produit pas avec des solutions d'amidon de maïs dégraissé et autoclavé; mais si une telle solution est additionnée d'iode et ensuite soumise à l'électrodialyse, la combinaison bleue de l'amylose se dépose sur la membrane anodique ou précipite par électrodécantation. On arrive ainsi à une solution qui ne donne pas de couleur bleue mais immédiatement une couleur rouge-violet avec l'iode et qui doit être considérée comme exempte d'amylose. Nous avons alors isolé l'amylopectine de cette solution et l'avons soumise à la dégradation par la β -amylase: 62% sont dégradés en maltose, dans le cas de l'amylopectine de maïs (fig. 1).

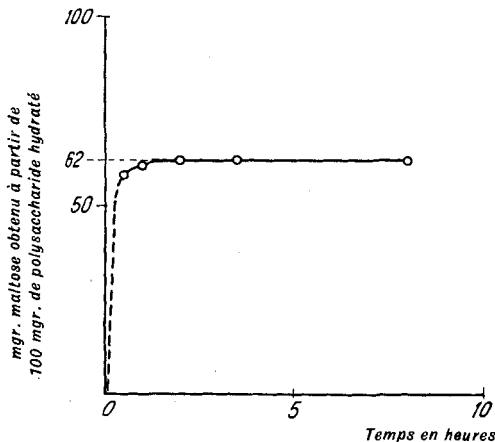


Fig. 1.

Dégradation de l'amylopectine de maïs pure par la β amylase.

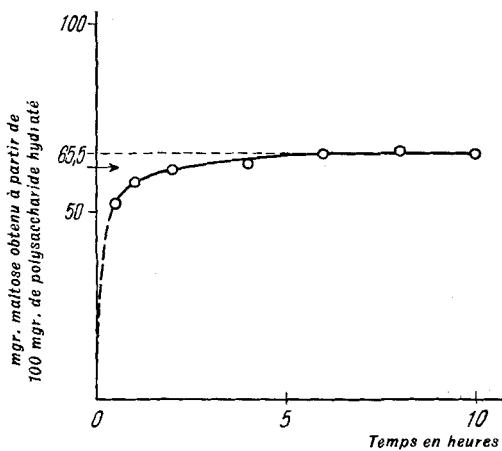


Fig. 2.

Dégradation de l'amylopectine de maïs brute (8% amylose) par la β amylase
→ limite pour l'amylopectine.

L'amylopectine de pomme de terre préparée comme décrit dans la communication précédente est facilement libérée des traces d'amylase par adsorption sur du coton dans une colonne chromatographique. La dégradation enzymatique est alors de 59 %.

Ces valeurs limites de dégradation sont sensiblement supérieures aux valeurs indiquées dans la littérature pour l'amylopectine exempte d'amylase¹⁾. Nous devons attribuer cette différence au phénomène de vieillissement qui a empêché, dans les recherches antérieures, l'attaque jusqu'à la vraie limite de dégradation. Il s'ensuit qu'une solution d'amylopectine est capable de vieillir, c'est-à-dire de former des régions cristallines. Comme cela a été mis en doute par *Kerr*¹⁾, nous faisons remarquer que les grains d'amidon du waxy-maïs — qui sont tout à fait exempts d'amylase — présentent la même diffraction des rayons X que les grains de maïs ordinaire. L'amylopectine se trouve donc sous forme cristalline dans le grain du waxy-maïs. On constate cependant que l'amylopectine cristallise beaucoup moins rapidement que l'amylase. Une solution d'amylopectine de maïs préparée comme décrit ci-dessus donne un gel légèrement trouble après 3 jours à 4° si la solution contient 10% d'amylopectine. Si elle en contient 5%, la formation du gel ne se termine qu'après 15 jours. Nous devons considérer cette gélatinisation comme une cristallisation en micelles à franges où les parties cristallines sont liées entre elles par des fils moléculaires enrobés de solution.

Les limites de dégradation que nous avons obtenues montrent que beaucoup plus que la moitié des restes de glucose de l'amylopectine se trouvent dans les branches extérieures de la molécule, car seules ces dernières subissent la dégradation par la β -amylase. Une amylopectine du poids moléculaire 180 000 composée de 1100 monomères, perd donc environ 670 de ces monomères par la dégradation. On a trouvé 4%, soit 46 groupes terminaux non-réducteurs dans cette molécule²⁾ et par conséquent 45 embranchements. Chacune des branches sera composée en moyenne de $670:46 = 15$ restes de glucose, auxquels s'ajoutent encore 1 à 2 restes formant les « moignons » qui ne sont pas scindés par l'enzyme; il reste donc $1100 - 670 - 70 = 360$ monomères dans le reste de la molécule; la longueur des chainons entre les 45 embranchements ne dépasse donc pas $360:45 = 8$ monomères. Ces résultats confirment les conclusions de *K. H. Meyer* et *P. Bernfeld*³⁾ et les récents résultats de *M. A. Swanson*⁴⁾ obtenus avec une méthode tout à fait différente.

Cette constatation nous conduit aux considérations suivantes concernant la formation de la molécule de l'amylopectine. L'on peut

¹⁾ *R. W. Kerr*, Arch. of Biochem. **7**, 376 (1945); *R. H. Hopkins*, Adv. in Enzym. **6**, 389 (1946). ²⁾ Voir communication 43, p. 1545.

³⁾ *K. H. Meyer*, Adv. in Enzym. **3**, 126 (1943).

⁴⁾ *M. A. Swanson*, J. Biol. Chem. **172**, 825 (1948).

admettre que l'amylopectine est formée à partir du glucose-1-phosphate par l'action simultanée de deux enzymes: la phosphorylase et l'iso-phosphorylase, dont la première établit les liaisons 1—4 et la deuxième les liaisons 1—6¹⁾.

Admettons maintenant avec *Bernfeld* et *Meutémédian*²⁾ que le degré de ramification est déterminé par le rapport des vitesses de formation de ces deux sortes de liaisons et, par conséquent, par les rapports des concentrations des deux enzymes; quel sera le résultat si une molécule d'amylopectine commence à se former dans un excès de glucose-1-phosphate et en présence de 25 fois plus de phosphorylase 1—4 que d'iso-phosphorylase 1—6? Admettons qu'un reste de glucose peut se fixer en liaison 1—6 sur n'importe quel reste de glucose de la molécule formée jusqu'ici. Il résulterait de ces hypothèses que dans la molécule entière le rapport du nombre total des restes de glucose au nombre de restes sur lesquels sont fixées des branches sera bien 25:1, mais la répartition des embranchements sera inégale. En effet, les parties de la molécule qui ont pris naissance les premières, c'est-à-dire celles voisines du groupe aldéhydique et loin des groupes terminaux, ont été exposées le plus longtemps à l'action de l'enzyme et porteront par conséquent plus d'embranchements que les parties les plus jeunes, c'est-à-dire les branches extérieures. Il s'ensuit que ces branches doivent être plus longues que les chainons entre les embranchements; ceci est en concordance avec le résultat de la dégradation.

Nous avons finalement comparé la vitesse de formation de maltose obtenue dans une solution d'amylopectine avec celle obtenue dans une solution d'amylose de même concentration (en poids). Comme l'amylopectine possède beaucoup plus de groupes terminaux non réducteurs qui, seuls, sont attaqués par la β -amylase, on devrait s'attendre à une vitesse bien supérieure chez l'amylopectine. C'est en effet le cas, comme le montre le tableau, mais on ne peut pas constater une proportionnalité entre la concentration des groupes terminaux et la vitesse de la réaction.

Tableau.

mgr. de maltose libéré à partir de 100 mgr. de polysaccharide par la β -amylase en excès.

	t = 0° Amylose A ₂	t = 0° Amylopectine	t = 25° Amylose A ₂	t = 25° Amylopectine
10 min. . .	10	18	29	42
15 min. . .	19	26	38	51
20 min. . .	23	35	50	55

¹⁾ K. H. Meyer et P. Bernfeld, Helv. **25**, 399 (1942); G. T. Cori et C. F. Cori, J. Biol. Chem. **151**, 57 (1943).

²⁾ P. Bernfeld et A. Meutémédian, Nature (sous presse).

Si de l'amidon ou de l'amylopectine brute contenant de l'amylose sont soumis à la dégradation, les vitesses des deux réactions se superposent (voir fig. 2).

Amylopectine brute. L'amylopectine de maïs obtenue selon *Schoch*¹⁾ (autoclavage de l'amidon dégraissé en présence de butanol et précipitation du filtrat par le méthanol), contient encore, selon *Kerr*²⁾, environ 8% d'amylose. Elle est dégradée à 65,5% (voir fig. 2). En tenant compte de la teneur en amylose, on calcule une dégradation de 61,5% pour l'amylopectine pure.

Purification de l'amylopectine de maïs. Une solution d'amylopectine à 1% est additionnée d'une solution 0,02-n. d'iode jusqu'à l'apparition d'une couleur bleue intense. Elle est soumise à l'électrodialyse sous 80 mA. et 120 V. Le composé d'addition bleu de l'amylose avec l'iode se dépose à l'anode ou au fond. On rajoute de l'iode et continue l'électrodialyse, jusqu'à ce que l'iode produise une couleur rouge violet. On décolore par quelques gouttes SO_3HNa , neutralise, dialyse et électrodialyse. On concentre au vide et précipite au méthanol. Le produit est dégradé à 62% (voir fig. 1).

RÉSUMÉ.

Par la méthode de dégradation décrite récemment, l'amylopectine est dégradée par la β -amylase à 59—62%. L'arrangement des monomères dans l'amylopectine et sa formation enzymatique sont discutés.

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

205. Recherches sur l'amidon, 42³⁾.

Dosages des acides formés lors de l'oxydation des polyols par le periodate

par Kurt H. Meyer et P. Rathgeb.

(29 VII 48)

L'oxydation des polyols par l'acide périodique, décrite par *Malaprade*⁴⁾, s'est avérée précieuse pour la détermination de la constitution d'hydrates de carbone.

Non seulement la quantité d'acide périodique consommé nous donne des indications, mais aussi le dosage des produits de réaction, soit aldéhydes soit acides.

Des acides carboxyliques, principalement l'acide formique, prennent naissance lorsque l'un des groupes suivants se trouve dans la molécule à oxyder:

¹⁾ *Th. J. Schoch*, Advances in Carbohydrate Chemistry 1, 247 (1945); *G. Noeling* et *P. Bernfeld*, Helv. 31, 286 (1948).

²⁾ *R. W. Kerr*, Arch. Biochem. 7, 377 (1945).

³⁾ 4^e communication, Helv. 31, 1536 (1948).

⁴⁾ *M. L. Malaprade*, Bl. [5] 1, 833 (1934); Bl. [4] 43, 683 (1928).