

thylgruppen in den Phenolkern des p-(Diäthylaminoacetyl-amino)-phenol-alkyläthers aufmerksam gemacht. Dabei konnte beim Diäthylaminoacetyl-amino-xylol-alkyläther, d. h. der Kombination der Strukturen des Xylocains und des Phenacetins, eine stark erhöhte lokalanästhetische Wirksamkeit beobachtet werden.

Pharmazeutisches Institut  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich;  
Wissenschaftliche Forschungsabteilung  
der Dr. A. Wander AG., Bern.

### 31. Dosage de produits d'hydrolyse enzymatique de l'amidon par fermentation.

#### Recherches sur l'amidon 49

par Kurt H. Meyer et W. F. Gonon.

(21 XII 50)

On sait que l' $\alpha$ -amylase dégrade l'amidon d'abord en dextrines de poids moléculaire élevé, qui à leur tour sont scindées en glucose, maltose et oligosaccharides non dégradables<sup>1-7</sup>).

Pour déterminer ces produits aux divers stades de la dégradation enzymatique, on utilise de préférence une méthode biochimique. *Somogyi*<sup>4</sup>), puis *Meyer & Bernfeld*<sup>6</sup>) ont réussi à fermenter sélectivement par la levure de boulangerie, le glucose en milieu alcalin, et le glucose + le maltose en milieu neutre. Depuis, nous n'avons plus réussi à obtenir des levures de boulangerie présentant ces mêmes propriétés. Il y avait toujours, quelles que fussent les conditions utilisées, attaque simultanée des dextrines. *Myrbäck*<sup>8</sup>) a observé ce même phénomène avec la levure de boulangerie suédoise qu'il a employée.

Pour pallier cet inconvénient, nous avons cherché d'autres levures possédant une fermentation spécifique. La détermination bio-

<sup>1</sup>) *E. Ohlsson*, Z. Physiol. Ch. **189**, 17 (1930); C. r. trav. lab. Carlsberg **16**, N° 7 (1926).

<sup>2</sup>) *C. S. Hanes*, Can. J. Res. **13** (B), 185 (1935).

<sup>3</sup>) *M. Samec & M. Blinz*, Koll. ch. Beih. **49**, 75 (1939).

<sup>4</sup>) *M. Somogyi*, J. Biol. Chem. **134**, 301 (1940).

<sup>5</sup>) *K. Myrbäck*, Bioch. Z. **307**, 132 (1941).

<sup>6</sup>) *K. H. Meyer & P. Bernfeld*, Helv. **24**, 359 E (1941).

<sup>7</sup>) *F. Smits van Waesberge*, thèse Delft 1941.

<sup>8</sup>) *K. Myrbäck*, Bioch. Z. **304**, 147 (1940); *K. Myrbäck & E. Leissner*, Arkiv Kem. Mineral. Geol. **17 A**, N° 18 (1943).

chimique des sucres, à l'aide de levures spécifiques, a été décrite pour la première fois par *Kluyver*<sup>1)</sup>. Un de ses collaborateurs, *Smits van Waesberge*<sup>2)</sup>, a étudié systématiquement l'action de différentes espèces sur un mélange de sucres. Il trouva que le *Zygosaccharomyces marxianus* fermente uniquement le glucose et que le *Saccharomyces uvarum* (*Beijerinck*) fermente le glucose + le maltose.

Sur le conseil de M. *Kluyver*, nous avons remplacé le *Zygosaccharomyces marxianus* par *Candida monosa* = *Torula monosa* (*Kluyver*, *Diddens* et *Lodder*). Nos essais ont montré que *Candida monosa* fermente en effet uniquement le glucose, mais que par contre *Saccharomyces uvarum* attaque aussi les dextrines.

Nous avons alors été contraints de rechercher une autre espèce de levure ne fermentant que le glucose + le maltose, et selon le conseil de M. *Kluyver*, nous avons essayé *Saccharomyces Chodati*<sup>3)</sup>. Celui-ci ne fermente effectivement pas les dextrines, tétraoses et trioses; par contre l'isomaltose<sup>4)</sup> est fermenté, quoique beaucoup plus lentement que le maltose.

Voici le principe de la méthode que nous avons utilisée:

Sur une première prise, on mesure le pouvoir réducteur total A. Sur une deuxième prise, on élimine le glucose par fermentation au moyen de la levure *Candida monosa* et mesure ensuite le pouvoir réducteur B représentant maltose + dextrines. Sur une troisième prise, on fermente le glucose et le maltose par *Saccharomyces Chodati* et mesure le pouvoir réducteur C des dextrines. Sur une quatrième prise, le pouvoir réducteur E est mesuré après hydrolyse totale à l'acide chlorhydrique. Les pouvoirs réducteurs du glucose et du maltose sont alors donnés respectivement par A—B, et B—C. On en calcule les quantités de glucose et de maltose (exprimé sous forme de monohydrate) correspondantes. La quantité des dextrines résiduelles est égale à la quantité du sucre total obtenu après l'hydrolyse complète, moins la quantité de glucose et de maltose. Pour déterminer le degré de polymérisation des dextrines résiduelles, on dose le pouvoir réducteur C avant et après hydrolyse D. Le rapport entre ces deux valeurs indique le degré de polymérisation (voir tableau II).

La précision de notre méthode de fermentation a été contrôlée au moyen de mélanges artificiels de sucres. Les résultats ont été exacts à  $\pm 2\%$  près (voir tableau I).

1) *A. J. Kluyver*, Biochem. suikerbepalingen, Leiden (1914).

2) *F. Smits van Waesberge*, thèse Delft 1941.

3) L'Institut de Botanique de l'Université de Genève (Prof. *Chodat*) nous a aimablement fourni cette levure.

4) Nous remercions vivement M. *A. Georg* d'avoir mis de l'isomaltose à notre disposition. Cf. *A. Georg & A. Pictet*, Helv. **9**, 612 (1926).

**Tableau I.**

Mélange de sucres préparé artificiellement.

|  | Pouvoir réducteur<br>en mg Cu à partir<br>de 10 cm <sup>3</sup> de solu-<br>tion initiale | mg sucre<br>trouvé | mg sucre<br>présent |
|--|---|--------------------|---------------------|
| Solution initiale . . . . .                                      | 70,6 = A  |                    |                     |
| Solution initiale fermentée par<br>Candida monosa . . . . .      | 49,8 = B  |                    |                     |
| Solution initiale fermentée par<br>Saccharomyces Chodati . . . . | 0,0 = C   |                    |                     |
| Solution initiale hydrolysée . .                                 | 109,8 = E   |                    |                     |
| Glucose: A-B . . . . .   | 20,8  | 10,2               | 10,0                |
| Maltose: B-C . . . . .   | 49,8  | 47,8               | 48,5                |
| Sucre total: E . . . . .   | 109,8   | 58,2               | 58,5                |

**Tableau II.**Amylose A<sub>1</sub> de pomme de terre<sup>1)</sup> dégradé à 49% des liaisons glucosidiques par l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc cristallisée<sup>2)</sup>.

|   | Pouvoir ré-<br>ducteur en<br>mg Cu à<br>partir de<br>10 cm <sup>3</sup> de la<br>solution<br>initiale | Sucre en mg<br>à partir de<br>10 cm <sup>3</sup> de la<br>solution<br>initiale | % du<br>sucre<br>total | Degré de<br>polyméri-<br>sation des<br>dextrines |
|---|---|--|------------------------|--|
| Solution initiale . . . . .   | 126,0 = A   |  |                        |  |
| Solution initiale fermentée par<br>Candida monosa . . . . .                         | 112,1 = B   |  |                        |  |
| Solution initiale fermentée par<br>Saccharomyces Chodati . . . .                    | 17,0 = C  |  |                        |  |
| Solution initiale fermentée par<br>Saccharomyces Chodati et<br>hydrolysée . . . . . | 50,4 = D  |  |                        | 3,0 = $\frac{D}{C}$                              |
| Solution initiale hydrolysée . .  | 264,5 = E   |  |                        |  |
| Glucose: A-B . . . . .  | 13,9  | 6,8  | 5,2                    |  |
| Maltose: B-C . . . . .  | 95,1  | 92,0   | 70,5                   |  |
| Dextrines . . . . .   |   | 31,2*)   | 24,3                   |  |
| Sucre total: E . . . . .  | 264,5   | 130,5  | 100,0                  |  |

\*) Calculé par la différence entre sucre total et (glucose + maltose).

**Partie expérimentale.***1. Culture des levures.*

a) *En petites quantités.* On suspend 1 kg de levure de boulangerie dans 2 l d'eau du robinet et on laisse la suspension dans une étuve à 50° pendant 24 h. Le mélange est alors bouilli sous agitation pendant 10 min., refroidi et centrifugé 10 min. à 3000 t/min. Le

<sup>1)</sup> K. H. Meyer & P. Rathgeb, *Helv.* **31**, 1533 (1948).<sup>2)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, *Helv.* **30**, 64 (1947).

culot est extrait une seconde fois par de l'eau bouillante. On obtient environ 3 l de bouillon artificiel.

50 g de feuilles de gélatine sont ajoutés à 500 cm<sup>3</sup> de bouillon artificiel et fondus au bain-marie. On refroidit à 30° et ajoute 0,5 g d'albumen ovi. On porte le pH à 7,5 avec quelques gouttes de NaOH 2-n., autoclave pendant 20 min. à 115°, filtre à chaud sur papier filtre plissé et distribue dans des erlenmeyers de 100 cm<sup>3</sup> et des éprouvettes. On y ajoute du glucose jusqu'à 5%, bouche au coton et stérilise dans l'autoclave à 105° pendant 20 min. Un autre milieu également approprié s'obtient de même manière, en remplaçant les 50 g de gélatine par 10 g d'agar-agar.

Le milieu solide est ensuite inoculé respectivement par des cultures pures de *Candida monosa* et de *Saccharomyces Chodati*, au moyen d'un fil de platine sous des conditions stériles. Les levures développées au cours de deux semaines dans l'étuve à 30° servent de produits standard et sont gardées au froid.

b) *En plus grandes quantités*<sup>1)</sup>. A 400 cm<sup>3</sup> d'eau de robinet dans un erlenmeyer de 1 l, on ajoute 100 cm<sup>3</sup> de bouillon artificiel, 40 g de glucose et 4 g de peptone. Le tout est stérilisé dans un autoclave à 105° pendant 20 min. Après refroidissement, le bouillon est inoculé au moyen d'un fil de platine sous des conditions absolument stériles. On place à 30° et fait barboter environ 100 l par heure d'air purifié par le glycérol. On obtient 20 à 30 g de levure en suspension après 60 h. On centrifuge, décante, lave 5 fois avec de l'eau distillée pour éliminer le glucose et suspend la levure dans 200 cm<sup>3</sup> d'eau. L'humidité de la levure centrifugée est déterminée d'après une méthode décrite antérieurement<sup>2)</sup>. Elle se monte en moyenne, pour les deux espèces de levures, à 35% d'eau libre.

## 2. Détermination des sucres.

a) *Dosage du glucose*: 10 cm<sup>3</sup> de suspension de *Candida monosa* sont centrifugés dans un tube taré pendant 10 min. On décante l'eau et on pèse la levure en pâte (environ 1 g). On ajoute 4 cm<sup>3</sup> d'une solution de NaOOC—CH<sub>3</sub> + 3 H<sub>2</sub>O 0,2-n. qui porte le pH à 6,4, et 10 cm<sup>3</sup> d'une solution contenant les sucres dont le pouvoir réducteur a été dosé selon *Bertrand* dans une prise aliquote (10 cm<sup>3</sup>). Cette prise ne doit pas contenir plus de 50 mg de glucose. On laisse fermenter pendant 4 h. sous lente agitation à 35°, centrifuge 10 min. à 3000 t/min., filtre et dose le glucose, selon *Bertrand*, sur 10 cm<sup>3</sup>. On déduit ce pouvoir réducteur, corrigé à cause de la dilution (35% de l'eau libre dans la levure), du pouvoir réducteur total de la solution non fermentée. La différence entre les deux valeurs donne le pouvoir réducteur qui correspond au glucose présent.

b) *Dosage du glucose + maltose*. 20 cm<sup>3</sup> de suspension de *Saccharomyces Chodati* sont centrifugés et décantés. A la levure en pâte (2 g) on ajoute 4 cm<sup>3</sup> d'une solution NaOOC—CH<sub>3</sub> + 3 H<sub>2</sub>O 0,2-n. et 10 cm<sup>3</sup> d'une solution, contenant au maximum 50 mg de glucose et 100 mg de maltose. Après 20 h. de fermentation sous lente agitation à 35°, on centrifuge, filtre, et détermine le pouvoir réducteur selon *Bertrand*. En déduisant ce dernier du pouvoir réducteur total, on obtient la quantité de glucose + maltose.

c) *Dosage des dextrines résiduelles et détermination de leur degré de polymérisation*. Une prise de 10 cm<sup>3</sup> est soumise à l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2-n. à reflux pendant 1 h. Son pouvoir réducteur correspond au sucre total exprimé en glucose. On soustrait donc de la quantité totale de sucre les valeurs de glucose + maltose pour obtenir la quantité des dextrines résiduelles.

Pour déterminer le degré de polymérisation, on fermente par *Saccharomyces Chodati* et dose le pouvoir réducteur avant et après l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2-n. à reflux pendant 1 h. Le rapport entre les deux pouvoirs réducteurs indique le degré de polymérisation des dextrines résiduelles.

<sup>1)</sup> Nous remercions vivement M. le Prof. *Kluyver* d'avoir bien voulu nous donner ces indications.

<sup>2)</sup> *K. H. Meyer & P. Bernfeld*, *Helv.* **24**, 359 E (1941).

### 3. Fermentation de l'isomaltose.

Trois solutions de 10 cm<sup>3</sup> contenant, la première 30 mg de maltose, la seconde 30 mg d'isomaltose et la troisième un mélange de 15 mg de maltose + 15 mg d'isomaltose, sont fermentées dans les conditions standard pendant 10 h. par 2 g de *Saccharomyces Chodati*.

Après fermentation, le pouvoir réducteur de la première solution est nul, celui de la deuxième correspond à 20 mg de sucre et celui de la troisième équivaut à 10,5 mg seulement. L'isomaltose n'est donc fermenté qu'à 30% par le *Saccharomyces Chodati*.

### RÉSUMÉ.

Le glucose, le maltose et les dextrines résiduelles, produits lors de la dégradation  $\alpha$ -amylatique de l'amidon, sont dosés par l'emploi de levures spécifiques.

*Candida monosa* fermente uniquement le glucose tandis que *Saccharomyces Chodati* fermente le glucose et le maltose. L'isomaltose est attaqué beaucoup plus lentement alors que le maltotriose et les oligosaccharides ne sont pas attaqués du tout.

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

## 32. La dégradation de l'amylose par les $\alpha$ -amylases.

### Recherches sur l'amidon 50

par Kurt H. Meyer et W. F. Gonon.

(21 XII 50)

La dégradation enzymatique de l'amidon par les diastases, réaction importante tant du point de vue industriel que biologique, a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, les auteurs n'ont en général pas tenu compte de la complexité de cette réaction.

En effet, l'amidon est un mélange de deux polysaccharides, l'amylose et l'amylopectine, qui sont attaqués de manière différente par les enzymes. D'autre part, les extraits de malt qui ont été généralement employés contiennent plusieurs enzymes différents.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'action d'enzymes purs (si possible cristallisés) sur l'amylopectine pure ou l'amylose pur. C'est dans ce but que nous avons étudié, il y a quelques années, la dégradation de l'amylose par l' $\alpha$ -amylase de malt<sup>1)</sup>.

Nous avons pu distinguer deux réactions de vitesse nettement différente. D'abord une réaction primaire rapide qui aboutit à la scission de 40 à 45 % des liaisons glucosidiques de l'amylose. Pendant cette réaction, l'enzyme scinde des liaisons glucosidiques quelconques des

<sup>1)</sup> K. H. Meyer & P. Bernfeld, *Helv.* **24**, 359 E (1941).