

3. Fermentation de l'isomaltose.

Trois solutions de 10 cm^3 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 α -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 α -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 avions étudié, il y a quelques années, la dégradation de l'amylose par l' α -amylase de malt¹).

Nous avions 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

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

chaînes d'amylose donnant ainsi des chaînes d'amylose plus courtes, puis des oligosaccharides, puis enfin du maltotriose et du maltose. Cette première réaction est suivie d'une réaction beaucoup plus lente, au cours de laquelle le maltotriose est scindé en glucose et en maltose.

Cependant, selon les conditions de l'essai, le degré de dégradation de l'amylose peut varier fortement. Celui-ci subit le phénomène du «vieillissement»¹⁾ au cours duquel ses molécules s'agglomèrent en associations micellaires et finalement en submicrons qui résistent à l'action de l'amylase.

Comme *Bernfeld & Studer-Pechat*²⁾ l'ont montré, le vieillissement dépend non seulement de la préparation d'amylose utilisée, mais aussi de la concentration de l'enzyme. A de faibles concentrations d'enzyme la partie de l'amylose qui n'est pas liée à l'enzyme forme des submicrons et est alors soustraite à l'action enzymatique. Le degré de scission en fonction du temps atteindra ainsi un palier qui, en réalité, ne correspond pas à la fin de la réaction. Pour faire repartir celle-ci, il suffit de rendre la solution alcaline ce qui détruit les submicrons et, après neutralisation, d'ajouter une nouvelle portion d'enzyme. Ce «rajeunissement» peut être répété chaque fois que l'on atteint un nouveau palier par suite du vieillissement, ce qui permet ainsi en plusieurs étapes d'atteindre la fin de la réaction. Par contre, à une forte concentration d'enzyme, l'amylose est dégradé si rapidement qu'il n'a pas le temps de former des submicrons et d'échapper ainsi à l'action de l'enzyme. On obtient alors en une seule fois un palier correspondant à une scission de 40 à 45% des liaisons glucosidiques.

Plusieurs travaux récents de *Myrbäck* et collaborateurs³⁾, se reportant à la dégradation de l'amidon par les α -amylases, sont en contradiction avec ce schéma de réaction. Remarquons tout de suite que *Myrbäck* néglige complètement le phénomène du vieillissement qui se produit non seulement avec l'amylose, comme nous venons de le rappeler, mais également avec l'amylopectine et par conséquent avec l'amidon qu'il emploie dans ses études. *Myrbäck*³⁾⁴⁾ affirme en outre que les α -amylases animales produisent seulement du maltose et que le glucose trouvé dans les produits de scission est dû à l'action d'une maltase présente comme impureté dans ces amylases. D'après lui, seule l' α -amylase de malt donnerait par elle-même du glucose parmi les produits de scission.

¹⁾ O. E. Stemberg & C. H. Bailey, *Cereal Chem.* **16**, 330 (1939); R. H. Hopkins, E. G. Stopher & D. E. Dolby, *J. Inst. Brewing* **46**, 426 (1940); R. H. Hopkins, D. E. Dolby & E. G. Stopher, *J. Inst. Brewing* **48**, 174 (1942).

²⁾ P. Bernfeld & H. Studer-Pechat, *Helv.* **30**, 1895 (1947).

³⁾ K. Myrbäck & W. Thorsell, *Svensk Kem. Tidsk.* **54**, 50 (1942); L. G. Sillén & K. Myrbäck, *Svensk Kem. Tidsk.* **56**, 142 (1944); K. Myrbäck, *Arkiv Kem. Mineral. Geol.* **26A**, Nr. 7 (1948); *Advances in Carbohydrate Chem.* **3**, 251 (1948).

⁴⁾ K. Myrbäck, *B. Örtenblad & W. Thorsell, Bioch. Z.* **316**, 424 (1944).

Nous avons donc entrepris des recherches sur la dégradation de l'amylose par différentes α -amylases purifiées (l' α -amylase de pancréas de porc cristallisée et l' α -amylase de malt cristallisée ou, dans certains essais, seulement hautement purifiée).

1. Influence du vieillissement.

Afin d'étudier plus à fond l'influence du phénomène du vieillissement sur la réaction, nous avons fait des recherches sur deux amyloses de poids moléculaire différent: amylose A₁ de pomme de terre et amylose A₁ de maïs¹⁾. Les poids moléculaires respectifs déterminés d'après la méthode réductométrique étaient: 11 500 et 40 000 (correspondant à des degrés de polymérisation de 72 et de 250)²⁾.

Nous avions constaté, il y a bien des années, que les solutions renfermant des fractions de poids moléculaire élevé, vieillissaient et précipitaient plus rapidement que celles de poids moléculaire plus bas³⁾. On devait donc s'attendre à ce que les deux amyloses vieillissant à des vitesses différentes, fussent attaquées différemment par les amylases. Nous avons pu montrer effectivement que le degré d'hydrolyse obtenu lorsque la réaction atteint le premier palier, dépend du poids moléculaire de l'amylose employé. Pour des concentrations d'enzyme identiques, on atteint un palier inférieur avec l'amylose de poids moléculaire 40 000 qu'avec l'amylose de poids moléculaire 11 500 (voir fig. 1, 2, 3 et 4).

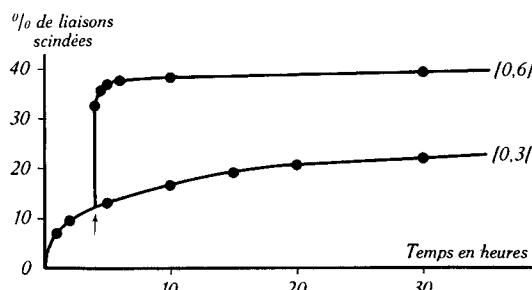


Fig. 1.

Dégénération de l'amylose de pomme de terre
d'un d.p. (degré de polymérisation) de 72
par l' α -amylase de pancréas de porc cristallisée.

[0,3] et [0,6] concentrations en enzyme (voir partie exp. § 2),
↑ = rajeunissement.

¹⁾ Nous définissons par A₁ les fractions obtenues par extraction aqueuse des grains gonflés mais non éclatés.

²⁾ K. H. Meyer & P. Rathgeb, Helv. **31**, 1533 (1948); K. H. Meyer, P. Bernfeld, P. Gürler & G. Noeling, Helv. **31**, 108 (1948).

³⁾ K. H. Meyer, P. Bernfeld & E. Wolff, Helv. **23**, 854 (1940); K. H. Meyer, P. Bernfeld & J. Press, Helv. **23**, 1465 (1940).

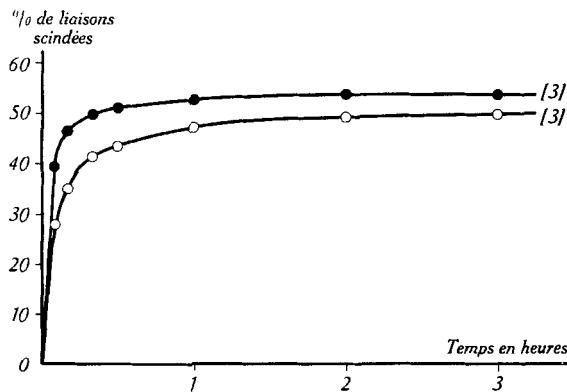


Fig. 2.

Dégradation par l' α -amylase de pancréas de porc de
 —●— l'amylose de pomme de terre (degré de polymérisation 72),
 —○— l'amylose de maïs (degré de polymérisation 250),
 [3] concentration d'enzyme.

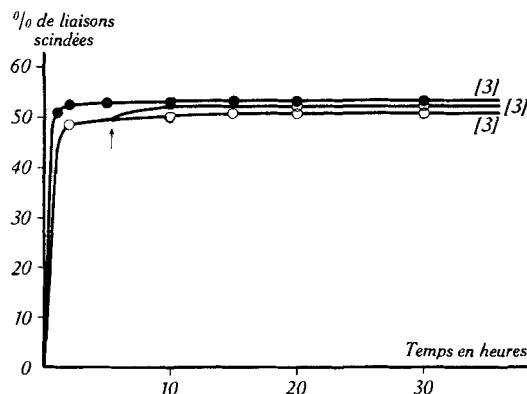


Fig. 3.

Dégradation par l' α -amylase de pancréas de porc de
 —●— l'amylose de pomme de terre (d.p. 72),
 —○— l'amylose de maïs (d.p. 250),
 [3] concentration d'enzyme,
 ↑ = rajeunissement.

Nos essais avec l' α -amylase de pancréas de porc et celle de malt, ont en outre confirmé nos constatations antérieures obtenues avec les mêmes amylases et l'amylase de bactérie, sur l'effet de la concentration d'enzyme sur la hauteur du palier¹⁾. Il nous semble donc que ces résultats montrent d'une manière définitive l'influence du vieillissement du substrat sur le cours de la réaction.

¹⁾ P. Bernfeld & H. Studer-Pech, Helv. **30**, 1895 (1947).

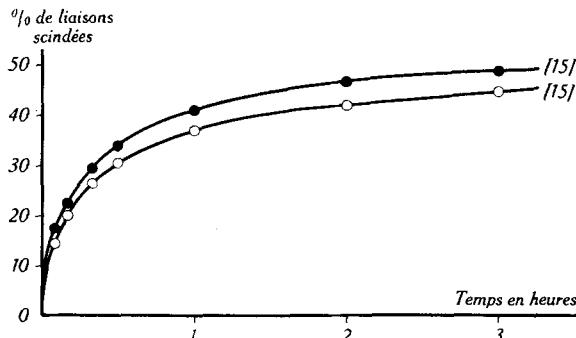


Fig. 4.

Dégradation par l' α -amylase de malt de
 —●— l'amylose de pomme de terre (d.p. 72),
 —○— l'amylose de maïs (d.p. 250),
 [15] concentration d'enzyme.

2. L'affinité de l'enzyme pour le substratum.

Cependant le vieillissement et la concentration de l'enzyme ne sont pas les seuls facteurs qui influencent le cours de la dégradation. Il y en a d'autres encore: l'affinité de l'enzyme pour les dextrans et oligosaccharides décroît en même temps que le poids moléculaire du substrat.

*Myrbäck*¹⁾ et *Hopkins*²⁾ ont montré que l'affinité de l' α -amylase de malt pour les dextrans ne donnant plus de coloration avec l'iode, est de beaucoup inférieure à son affinité pour l'amidon. *Myrbäck*³⁾ pense que cette différence est moins marquée en ce qui concerne les autres amylases. Mais il ne semble pas que des mesures comparatives de l'affinité des amylases pour l'amylose et les dextrans linéaires provenant de celui-ci aient été effectuées.

Nous avons trouvé que la vitesse initiale de dégradation de l'amylose de pomme de terre d'un degré de polymérisation de 72, par l'amylase de pancréas, est une centaine de fois plus grande que celle d'une dextrine linéaire d'un degré de polymérisation de 12. Ces vitesses sont fortement influencées par la concentration de l'enzyme, ce qui prouve que les différences observées doivent être attribuées à des différences d'affinité.

L'écart entre la vitesse d'hydrolyse de cet amylose et de ce dodécasaccharide est encore beaucoup plus grand pour l'amylase de malt. Les courbes de dégradation de l'amylose par l' α -amylase de pancréas

¹⁾ K. Myrbäck & N.O. Johansson, Arkiv kem. Mineral. Geol. **20A**, Nr. 6 (1945); L.G. Sjöllén & K. Myrbäck, Svensk Kem. Tidskr. **56**, 142 (1944); K. Myrbäck & E. Sihlbom, Arkiv Kem. **1**, Nr. 1 (1949).

²⁾ R.H. Hopkins, Advances in Enzym. **6**, 389 (1946).

³⁾ K. Myrbäck, Advances in Carbohydrate Chem. **3**, 251 (1948).

et de malt, sont représentées dans les fig. 2 et 4. Les chiffres [3] et [15] représentent les concentrations d'enzyme utilisées, et signifient que la dégradation initiale de l'amidon de *Zulkowski* ou de l'amylose est cinq fois plus rapide par la quantité d' α -amylase de malt mise en jeu que par celle d'amylase de pancréas. Comme le montre la comparaison des fig. 2 et 4, ce rapport change très rapidement au cours de la réaction. Effectivement, lorsque 40 % des liaisons glucosidiques sont hydrolysées (correspondant à un degré de polymérisation de 12 environ), la vitesse de dégradation de ces dextrines par l' α -amylase de malt est environ dix fois plus petite que par l' α -amylase de pancréas.

La différence de l'affinité de l'amylase de malt pour l'amylose et le dodécasaccharide linéaire est donc extrêmement importante. La dégradation α -amylatique se distingue dès lors nettement de l'hydrolyse acide des polysaccharides où toutes les liaisons glucosidiques sont attaquées avec la même probabilité, quel que soit le degré de polymérisation de la molécule dans laquelle elles se trouvent.

Pour cette sorte de dégradation, *Kuhn*¹⁾ a développé une théorie quantitative. Elle s'applique toutefois uniquement au début de la dégradation enzymatique, mais elle n'est plus valable pour la suite de la réaction, car la différence d'affinité précitée aura l'effet suivant: la probabilité de scission des liaisons dans une molécule d'amylose ou dans un fragment de poids moléculaire élevé est plus grande que la probabilité de scission des liaisons dans une molécule de dextrine. A tout moment de la dégradation, le p. m. réel des chaînons se rapprochera donc plus du p. m. moyen que si la probabilité de scission des liaisons glucosidique était indépendante du p. m. du chaînon qui la contient. Autrement dit, cette différence d'affinité provoquera une homogénéité plus grande des produits de la dégradation α -amylatique que des produits de la dégradation par un acide. D'autre part, la vitesse de dégradation, exprimée en proportion de liaisons scindées par unité de temps, ira en diminuant au fur et à mesure que la dégradation sera plus avancée. Ce ralentissement pourra faire croire à un palier avant la fin de la réaction. *Myrbäck* a déjà donné la même explication au phénomène analogue observé sur l'amidon.

Lorsqu'on se trouve en présence d'un très gros excès d'enzyme de telle sorte que le ou plutôt les substrats soient saturés, la courbe devient celle d'une réaction monomoléculaire. L'écart entre la vitesse de dégradation des polysaccharides et des dextrines tendra à disparaître, le palier n'apparaîtra qu'à la fin de la réaction, et la composition du mélange se rapprochera de celle prévue par la théorie de *Kuhn*¹⁾. Toutes ces considérations sont également valables pour la dégradation de l'amylopectine.

¹⁾ *W. Kuhn*, B. 63, 1503 (1930).

3. L'inhibition par le maltose.

Un autre facteur important est l'inhibition de l'action amyloytique par le maltose. D'après la théorie actuellement acceptée, on distingue deux cas principaux limites d'inhibition¹⁾: l'inhibition non compétitive et l'inhibition compétitive. Dans le premier cas, l'inhibiteur réagit réversiblement avec l'enzyme pour former un composé d'addition inactif:

$$\frac{(E_0 - EI)(I_0 - EI)}{EI} = K_1, \quad (1)$$

où E_0 et I_0 sont les concentrations initiales d'enzyme et d'inhibiteur, et EI la concentration du complexe inactif. Le substrat n'a aucune influence sur la formation du complexe inactif; on en conclut que le substrat et l'inhibiteur se fixent à des groupes différents de l'enzyme. L'action de l'inhibiteur a dans ce cas le même effet qu'une diminution de la concentration de l'enzyme:

$$\frac{v}{v_1} = \frac{E_0}{E_0 - EI}, \quad (2)$$

où v est la vitesse d'hydrolyse en absence et v_1 en présence d'inhibiteur.

De (1) et (2) on peut déduire par simple transformation algébrique:

$$\frac{v}{v_1} = 1 + \frac{I_0 - EI}{K_1} \quad (3)$$

Quoique (à concentration d'enzyme égale) v et v_1 dépendent de S (la concentration du substrat) et de I_0 , le rapport v/v_1 sera indépendant de S et uniquement dépendant de I_0 .

Dans le cas de l'inhibition compétitive où l'inhibiteur se fixe d'une façon réversible au même groupe de l'enzyme que le substratum, la valeur de ce quotient v/v_1 dépend aussi bien de S que de I_0 .

Tableau I.
Inhibition de la dégradation de l'amylase (d.p. 72).

Inhibiteur	Concen- tra- tion d'inhibi- teur en mg/20 cm ³	Concentration d'amylase en mg/20 cm ³					
		40		20		10	
		après 8 min.		après 4 min.		après 2 min.	
		N° de l'échelle	% des liaisons scindées	N° de l'échelle	% des liaisons scindées	N° de l'échelle	% des liaisons scindées
sans	—	7-6	8,6	9	11,3	11-10	13,6
maltose	8	6-5	7,8	9-8	10,4	10	12,3
maltose	16	5	7,3	7	9,0	9	11,3
maltose	32	4	6,3	6-5	7,8	8	9,5

¹⁾ E. R. Ebersole, C. Guttentag & P. W. Wilson, Arch. Biochem. **3**, 399 (1944).

*Schwimmer*¹⁾ a fait l'importante observation que le maltose est un inhibiteur non compétitif de l' α -amylase de malt. Nous arrivons au même résultat pour l' α -amylase de pancréas de porc, comme le montre le tableau I et la fig. 5, où les valeurs v/v_1 sont portées en fonction de I et de S .

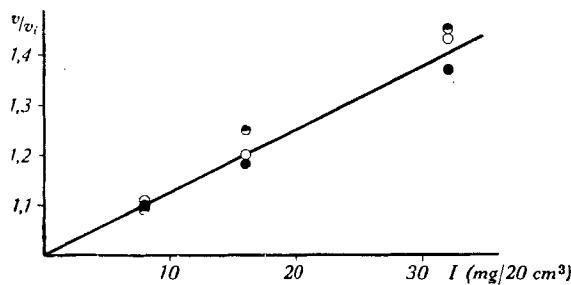


Fig. 5.

Comparaison des vitesses d'hydrolyses non inhibées (v) et inhibées (v_1) à différentes concentrations d'inhibiteur I et de substrat:

- 40 mg d'amyolose (d.p. 72)/20 cm³,
- ◐ 20 mg d'amyolose (d.p. 72)/20 cm³,
- 10 mg d'amyolose (d.p. 72)/20 cm³.

La nature non compétitive de l'inhibition par le maltose est aussi mise en évidence par le fait que le rapport v/v_1 (à concentrations d'enzyme et d'inhibiteur égales) est le même pour l'amyolose et pour des oligosaccharides de poids moléculaire beaucoup plus faible (voir tableau II).

Tableau II.
Inhibition de la dégradation d'une dextrine (d.p. 12).

Durée de réaction en min.	Concentration de la dextrine en $\text{mg}/20 \text{ cm}^3$	% des liaisons scindées sans inhibiteur	inhibiteur 32 mg de maltose/ 20 cm^3
15	20	7,1	5,5
30	20	13,1	10,5
60	20	21,2	16,5

Ni la nature, ni la concentration du substratum n'influencent donc l'inhibition relative de l'enzyme par le maltose: celui-ci doit donc se fixer à une autre place de l'enzyme que le substrat. Ce résultat peut expliquer le phénomène curieux que le maltose est complètement réfractaire à l'action hydrolytique des amylases. On peut admettre que, dans le composé enzyme-substratum, la liaison glucosidique est rendue labile par l'arrangement atomique de ce complexe; or, si le maltose se fixe d'une autre façon que l'amyolose à l'enzyme, le complexe ainsi formé aura d'autres propriétés et le groupe glucosidique restera stable.

¹⁾ S. Schwimmer, J. Biol. Chem. 186, 181 (1950).

Tout ce qui précède explique aussi le résultat absolument négatif des essais de synthèse d'oligosaccharides au moyen d'amylases. Il est connu qu'une solution aqueuse concentrée de glucose donne avec des catalyseurs spécifiques (maltase)¹⁾ et non spécifiques (H^*), des produits dits de «réversion»; ce sont des produits de condensation entre un groupe réducteur et un groupe hydroxyle d'une autre molécule de glucose. On devrait donc s'attendre à ce que le maltose donne aussi des produits de réversion — oligosaccharides — si on l'expose en solution concentrée à l'action d'une amylase. L'essai a montré que même à des concentrations très élevées d'enzyme, aucune trace d'un oligosaccharide n'est formée même après plusieurs semaines. Comme il ne peut s'agir d'une question d'équilibre, nous attribuons ce résultat à l'inhibition pratiquement complète de l' α -amylase par le maltose.

Il ressort de tout ce qui précède que la dégradation est ralentie par trois phénomènes différents qui se superposent: le vieillissement, la diminution de l'affinité au cours de l'hydrolyse et enfin l'inhibition par le maltose. L'action de tous ces facteurs peut être supprimée par un grand excès d'enzyme, mais seul le premier est influencé par le rajeunissement. Le vieillissement, en soustrayant les gros tronçons associés en micelles à l'attaque enzymatique, rend le mélange réactionnel très inhomogène; la diminution de l'affinité par contre tend à le rendre homogène.

Dans le cas de l'amylose, le phénomène du vieillissement est le plus important; ceci ressort déjà des courbes publiées par *Bernfeld & Studer-Pechá*²⁾. Dans le cas de l'amylopectine par contre, l'effet de la diminution d'affinité prédomine, comme nous allons le voir dans le travail suivant.

4. *Les produits d'hydrolyse α -amylolytique.*

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la composition du mélange se rapprochera de la répartition de *Kuhn*³⁾, aux très fortes concentrations d'enzyme; au contraire, à de très faibles concentrations, on obtient un mélange homogène. Vu la difficulté d'expérimentation de ces cas extrêmes, nous nous sommes placés à des concentrations moyennes d'utilisation pratique.

Les produits de réaction ont été analysés à différents intervalles de temps à l'aide de la méthode décrite dans la communication précédente. Ainsi que le montre le tableau III, on n'observe aucune différence entre les produits de scission de l'amylose de maïs et ceux de pomme de terre, ni entre l'action de l'amylase de malt et celle de

¹⁾ *H. Pringsheim & J. Leibowitz*, B. **57**, 1576 (1924); cf. *A. C. Hill*, Soc. **73**, 634 (1898); **83**, 578 (1903).

²⁾ *P. Bernfeld & H. Studer-Pechá*, Helv. **30**, 1895 (1947); voir aussi fig. 1 de ce travail.

³⁾ *W. Kuhn*, B. **63**, 1503 (1930).

pancréas. La composition du mélange dépend du degré de scission: on trouve au début des dextrines et peu de maltose; puis les dextrines diminuent tandis que le maltose augmente et le glucose apparaît. Celui-ci provient de la scission lente du maltotriose en maltose et glucose.

Tableau III.

Amylose de	Degré par α -amylase de	Degré de scission en %	Gl. en %	Malt. en %	Dext. en %	Degré de polym. des dextrines
maïs	pancréas	40	4,25	61,2	34,6	12,2
maïs	malt	45	4,32	67,2	28,5	6,9
p.d.t.	malt	50	5,56	72,6	21,8	2,9
p.d.t.	pancréas	54	10,25	80,6	9,1	2,6

Aucun de nos enzymes n'attaque le maltose; le glucose trouvé ne provient donc pas du maltose comme *Myrbäck* l'admet dans le cas de l'attaque par l'amylase de pancréas¹⁾, mais bien du maltotriose.

Le degré de polymérisation des dextrines non fermentées décroît au cours de la réaction; il tend vers 3, ce qui correspond au maltotriose, et ce dernier est très lentement scindé en maltose et glucose. L'amylase peut donc être entièrement transformé en sucres fermentescibles par les α -amylases.

Myrbäck qui a d'abord affirmé que le maltotriose n'est pas attaqué par l' α -amylase²⁾, a plus tard modifié son opinion³⁾.

Comme le montre l'essai No 4 du tableau III, dans lequel la scission est très poussée, on a trouvé 10,25% de glucose, 80,6% de maltose et 9,1% de dextrines. D'après leur degré de polymérisation, ces dextrines consistent presque uniquement en maltotriose. Ces 9,1% de dextrines donneraient finalement 6% de maltose et 3% de glucose; les produits finals de la scission α -amylolytique de l'amylase seront donc: $10,25 + 3 = 13,25\%$ glucose et 86,75% maltose.

Tout ce qui précède, confirme entièrement la théorie de l'attaque α -amylolytique que nous avons proposée il y a 9 ans⁴⁾: «Dans les longues chaînes, l'enzyme démolit indifféremment des liaisons glucosidiques quelconques, à l'exception des liaisons terminales dont la vitesse de dégradation est beaucoup plus petite. Les grands fragments sont dégradés plus rapidement que les petits; ne possédant que des liaisons glucosidiques terminales, le maltotriose est scindé très lentement en maltose et en glucose.» Un calcul approximatif montre qu'on doit obtenir finalement environ 86,6% de maltose et 13,4% de glucose.

¹⁾ K. Myrbäck & W. Thorsell, Svensk Kem. Tidsk. **54**, 50 (1942).

²⁾ K. Myrbäck & E. Leissner, Arkiv kem. mineral. Geol. **17A**, Nr. 18 (1943).

³⁾ K. Myrbäck & E. Sihlborn, Arkiv Kem. **1**, Nr. 1 (1949).

⁴⁾ K. H. Meyer & P. Bernfeld, Helv. **24**, 359 E (1941).

5. Théorie combinatoire de la dégradation.

Nous devons à M. A. Descloux¹⁾ une formulation mathématique de la théorie exposée ci-dessus:

On considère une chaîne de N éléments qui se décompose d'abord en deux sous-chaînes qui, à leur tour, se divisent en deux et ainsi de suite jusqu'à ce que la chaîne de N éléments soit décomposée en chaînons de deux éléments (« bioses ») et de trois éléments (« trioses »).

Les décompositions complètes de deux chaînes de N éléments seront considérées comme différentes si: a) l'ordre linéaire des bioses et trioses qui résultent de la décomposition n'est pas le même dans les deux chaînes; b) la suite des décompositions dyadiques successives n'est pas la même.

1. Nombre des décompositions différentes suivant a):

$$\sum_{(m, n)} \frac{(m+n)!}{m! n!},$$

la somme étant étendue à tous les couples (m, n) d'entiers positifs ou nuls satisfaisant à la relation $2m + 3n = N$.

2. Nombre des décompositions différentes suivant b):

$$\sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{2 \cdot 3 \cdot 4 \dots (m+n)}.$$

3. Nombre des décompositions différentes suivant a) et b):

$$\sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{2 \cdot 3 \cdot 4 \dots (m+n)} \cdot \frac{(m+n)!}{m! n!} = \sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{m! n!}.$$

4. Nombre des trioses fournis par toutes les décompositions différentes (prises une fois chacune):

$$\sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{2 \cdot 3 \cdot 4 \dots (m+n)} \cdot \frac{(m+n)!}{m! n!} \cdot n = \sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{m! n!} \cdot n.$$

5. Les trioses se décomposent finalement en un biose et un monose. La proportion des monoses dans l'ensemble de toutes les chaînes différentes de N éléments est donnée par la formule:

$$\frac{\sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{m! n!} \cdot n}{N \cdot \sum_{(m, n)} \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [4(m+n)-6]}{m! n!}}.$$

Suivant que N est pair ou impair, cette formule est égale à l'une des deux expressions suivantes:

¹⁾ Assistant à l'Institut de Statistique Mathématique de l'Université de Genève.

a) N pair:

$$\frac{\sum_k \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [2(N-2k)-6]}{\left(\frac{N}{2}-3k\right)! (2k)!} \cdot 2k}{N \sum_k \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [2(N-2k)-6]}{\left(\frac{N}{2}-3k\right)! (2k)!}}, \quad k = 0, 1, 2, \dots, \frac{N-2m}{6}$$

(m étant le plus petit entier tel que $(N-2m)$ soit un multiple de 6).

b) N impair:

$$\frac{\sum_k \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [2(N-2k)-8]}{\left(\frac{N-3}{2}-3k\right)! (2k+1)!} \cdot (2k+1)}{N \sum_k \frac{2 \cdot 6 \cdot 10 \dots [2(N-2k)-8]}{\left(\frac{N-3}{2}-3k\right)! (2k+1)!}}, \quad k = 0, 1, 2, \dots, \frac{N-2m-3}{6}$$

(m étant le plus petit entier tel que $(N-2m-3)$ soit un multiple de 6).

6. Exemples numériques (% = % de monose):

N	4	5	6	7	8	9	10	15	20	25
%	0,0	20,0	11,1	14,3	13,6	13,1	13,6	13,2	13,1	13,0

Le pourcentage de glucose calculé d'après la théorie combinatoire ($\sim 13,2\%$) concorde donc très bien avec le résultat expérimental (13,25%).

Partie expérimentale.

1. *Préparation des enzymes*: l' α -amylase de pancréas de porc a été préparé d'après la méthode publiée antérieurement¹⁾ et celle de malt d'après une modification apportée à la méthode de *Schwimmer & Balls*²⁾ à partir du produit «Diastafor» de la maison *Wander S.A.* à Berne.

2. *Dosage de l'activité enzymatique*: L'activité enzymatique est dosée d'après la méthode colorimétrique à l'acide dinitro-3,5-salicylique précédemment décrite³⁾. Elle est exprimée en mg de maltose hydraté formé dans les conditions habituelles du dosage. L'*unité d'amylase* est donc la quantité d'enzyme produisant 1 mg de maltose hydraté sous ces conditions standard; la *concentration de l'enzyme* (chiffres entre []) est donnée en unités par cm³.

Les dégradations enzymatiques s'effectueront au thermostat à 20°, au pH optimum d'activité de l'enzyme:

α -amylase de pancréas de porc: pH 6,9, tampon aux phosphates 0,2-m., contenant 0,07-m. de NaCl.

α -amylase de malt: pH 5,1, tampon acide acétique-acétate de sodium 0,16-m.

3. *Absence de maltase dans les préparations d'amylase*: On ajoute à 20 cm³ d'une solution d' α -amylase (concentration de [1,5]) tamponnée au pH optimum 5 cm³ d'une solution contenant 50 mg de maltose et maintient le mélange à 20°. On dose le pouvoir réducteur immédiatement après l'adjonction du maltose, puis après 2, 4, 8, 24 et 48 h. En prélevant chaque fois 2 cm³ de cette solution. L'augmentation du pouvoir réducteur est nulle pour les deux α -amylases, ce qui prouve l'absence de maltase.

¹⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv. **31**, 1831 (1948).

²⁾ S. Schwimmer & A. K. Balls, J. Biol. Chem. **179**, 1063 (1949).

³⁾ K. H. Meyer, Ed. H. Fischer & P. Bernfeld, Helv. **30**, 64 (1947); G. Noelting & P. Bernfeld, Helv. **31**, 286 (1948).

4. *Préparation de l'amylose:* Les amyloses de pomme de terre et de maïs ont été préparés d'après la prescription de Meyer & Rathgeb¹⁾.

1 g d'amylose est dissous par trituration dans 50 cm³ de NaOH 2-n. et centrifugé à 3000 t/min pendant 10 min. pour éliminer un très faible résidu de produit rétrogradé. Juste avant la dégradation, on neutralise partiellement la solution avec 46 cm³ de HCl 2-n. qui ramène le pH à 10 et l'on porte la solution à 250 cm³ par de l'eau distillée. La teneur exacte en amylose de la solution est déterminée après hydrolyse acide par dosage du glucose libéré²⁾). Sa concentration est comprise entre 0,32 et 0,38%.

5. *Dégénération de l'amylose:* A 50 cm³ d'une solution d' α -amylase, tamponnée au pH optimum, on ajoute sous forte agitation et en l'espace de 10 min., 250 cm³ de la solution du substratum. On suit la réaction en prélevant de temps en temps des prises de 10 cm³ et en les dosant selon Willstätter & Schudel³⁾). Le pouvoir réducteur, exprimé en mg de glucose, est rapporté au glucose total déterminé préalablement après hydrolyse. En portant le pourcentage des liaisons glucosidiques scindées en fonction du temps, on obtient les courbes représentées dans les fig. 1, 2, 3 et 4. Pour connaître la composition des produits de dégradation, on effectue d'autres prises qui sont analysées par la méthode décrite dans la publication précédente.

6. *Vitesse de dégradation des oligosaccharides:* Une solution contenant 1 g d'amylose est dégradée par l'amylase de pancréas de porc jusqu'à ce que 40% des liaisons glucosidiques aient été scindées, d'après la méthode précitée. On bloque la réaction enzymatique en chauffant le mélange réactionnel au bain-marie pendant 10 min. puis fermenter pendant 20 h. le glucose et le maltose par 10 g de Saccharomyces Chodati. La solution centrifugée et filtrée est remise pendant 10 min. au bain-marie. On concentre cette liqueur au vide à un volume de 40 cm³. On dose par hydrolyse acide la teneur en dextrines puis partage la solution en deux: les dextrines renfermées dans la première portion sont dégradées par l' α -amylase de pancréas de porc (concentration [9]). On suit la dégradation comme précédemment (voir tableau II). La deuxième portion sera utilisée pour les essais décrits sous § 7.

7. *Inhibition par le maltose:* On prépare 3 solutions alcalines à 0,2, 0,4 et 0,8% d'amylose. A 5 cm³ de chacune de ces solutions (contenant donc respectivement 10, 20 et 40 mg d'amylose total) on ajoute 5 cm³ d'un tampon aux phosphates, puis 8,5 cm³ d'eau. On ajoute 0,5 cm³ de HCl 2-n. (pour ajuster le pH à 6,9), puis 1 cm³ d'une solution d' α -amylase de pancréas de porc (concentration [0,18]). Après 2, 4 et 8 min., on prélève à chaque essai 5 cm³ auxquels on ajoute 2 cm³ d'acide acétique 2-n., puis 10 gouttes d'une solution d'iode 0,01-n. Après dilution convenable, on compare la coloration obtenue avec celle d'une échelle colorimétrique préalablement établie⁴⁾.

Dans des essais parallèles, on ajoute à chaque prise d'amylose 8, 16 et 32 mg de maltose. La dégradation est contrôlée comme indiqué. Le tableau I donne la relation entre la coloration à l'iode et le pourcentage d'hydrolyse. La fig. 5 montre les résultats obtenus avec et sans inhibiteur.

Afin d'étudier l'inhibition de la dégradation des oligosaccharides par le maltose, on ajoute à la solution de dextrine obtenue précédemment (§ 6) 32 mg de maltose. Cette dextrine est dégradée par une solution d' α -amylase de pancréas de porc (concentration [9]). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau II.

8. *Essais de synthèse d'oligosaccharides:* A 5 cm³ de solutions à 40, 60 et 80% de maltose, on ajoute 2 cm³ d'une solution d' α -amylase de pancréas de porc (concentration [30]). Le pH est maintenu à 6,9 par le tampon aux phosphates. Après 4, 10 et 20 jours, on fermentera le maltose par le Saccharomyces Chodati. La solution centrifugée et filtrée est soumise à l'hydrolyse acide. Le dosage d'après Bertrand n'indique aucun pouvoir réducteur, ce qui prouve l'absence totale d'oligo- ou de polysaccharides.

¹⁾ K. H. Meyer & P. Rathgeb, Helv. **31**, 1533 (1948).

²⁾ R. Willstätter & G. Schudel, B. **51**, 780 (1918).

³⁾ K. Linderström-Lang & H. Holter, Ann. chim. anal. **39**, 116 (1934).

⁴⁾ P. Bernfeld & M. Fuld, Helv. **31**, 1420 (1948).

RÉSUMÉ.

1. Nous avons étudié la dégradation d'un amylose A₁ de pomme de terre d'un degré de polymérisation de 72 et celle d'un amylose A₁ de maïs d'un degré de polymérisation de 250, par l'α-amylase de pancréas de porc cristallisée et par l'α-amylase de malt cristallisée.

2. La dégradation est fortement ralentie par le vieillissement (rétrogradation) de l'amylose; le phénomène est plus prononcé aux faibles concentrations d'enzyme et dans les cas d'amyloses de degré de polymérisation élevé.

3. Les amylases ont une affinité beaucoup plus faible pour les dextrines ou oligosaccharides que pour le substratum intact et les produits qui se forment au début de la dégradation. Ces différences d'affinité sont de beaucoup les plus grandes dans le cas de l'amylase de malt.

4. Par suite de la diminution d'affinité au cours de l'hydrolyse enzymatique, un ralentissement considérable se produit qui peut faire croire à l'existence d'un palier avant la fin de la réaction. Les produits de dégradation sont alors plus homogènes, leur p. m. réel se rapprochera plus du p. m. moyen que si toutes les liaisons glucosidiques étaient attaquées avec la même probabilité, par exemple lors de la dégradation par un acide.

5. Lorsque l'excès d'enzyme est très grand, la courbe de dégradation enzymatique se rapproche de celle d'une réaction monomoléculaire avec un palier à la fin de l'hydrolyse.

6. Les effets du vieillissement et de la diminution d'affinité se superposent, lors d'une dégradation. Les deux facteurs ralentissent la réaction, mais seul le premier peut être influencé par un rajeunissement; il tend à conserver les gros tronçons, tandis que le deuxième tend à les détruire.

7. Le fait que le maltose n'est pas attaqué par les amylases et qu'il est un inhibiteur non compétitif (cf. *Schwimmer*) peut s'expliquer par une fixation enzyme-substrat différente de celle de l'amylose et de la dextrine.

8. Les produits de réaction à différents stades de l'hydrolyse ont été analysés avec la méthode décrite dans le travail précédent.

9. Les produits finals d'hydrolyse par n'importe quelle α-amylase sont formés de 13% de glucose et de 87% de maltose, conformément à la théorie développée précédemment.

10. Une description mathématique de cette théorie est donnée.

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