

33. La dégradation de l'amylopectine par les α -amylases.

Recherches sur l'amidon 51

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

(21 XII 50)

Le but du présent travail est l'étude de la dégradation enzymatique de l'amylopectine, constituant prédominant de l'amidon, afin de la comparer avec celle de l'amylose qui fait l'objet du travail précédent. Les travaux effectués jusqu'ici ont utilisé comme substrat l'amidon, sans doute à cause de la difficulté de purifier l'amylopectine.

1. Comparaison avec l'amylose.

Nous avons préparé de l'amylopectine de maïs d'un poids moléculaire d'environ 45 000 (d. p. = degré de polymérisation 280) et de pomme de terre d'un poids moléculaire d'environ 180 000 (degré de polymérisation 1100)¹.

La dégradation de ces deux sortes d'amylopectine par l'amylase de pancréas de porc cristallisée et par celle de malt, a été étudiée du point de vue de la cinétique et du point de vue des produits d'hydrolyse. La fig. 1 montre qu'à conditions égales, la dégradation de l'amylopectine est plus lente que celle d'un amylose de même poids moléculaire. On doit toutefois noter que, si les déterminations chimiques (par réductométrie) et physiques (par osmométrie) des poids moléculaires concordent pour l'amylose, on trouve que le poids molé-

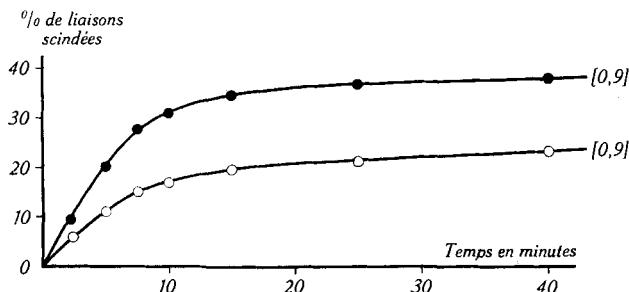


Fig. 1.

Début de la dégradation par l' α -amylase de pancréas de porc de

—●— l'amylose de maïs (d.p. 250),

—○— l'amylopectine de maïs (d.p. 280),

[0,9] concentration d'enzyme (voir mémoire préc.).

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

culaire «physique» de l'amylopectine est de beaucoup de fois supérieur à son poids moléculaire «chimique». Les particules de l'amylopectine sont donc des agrégats de molécules¹⁾.

*Alfin & Caldwell*²⁾ ont trouvé que l'amylose de maïs est plus lentement dégradé que l'amylopectine; comme ces auteurs ne disent rien au sujet de la méthode de dissolution de l'amylose, il est probable qu'ils ont travaillé avec des amyloses vieillis qui sont attaqués très lentement.

Nous avons constaté en outre qu'ici aussi deux réactions peuvent être observées: une réaction initiale rapide et une deuxième réaction lente. La différence de vitesse des deux réactions est plus grande pour l'amylopectine que pour l'amylose, comme le montre la comparaison des pentes des courbes initiales et terminales sur la fig. 1 p. ex.

2. Influence du vieillissement.

Comme nous l'avons vu, le ralentissement qui se produit au cours de la dégradation de l'amylose est dû en grande partie au vieillissement. Des essais de rajeunissement sur les solutions d'amylopectine au cours de la dégradation, ont donné des résultats positifs: après alcalinisation suivie d'acidification et adjonction d'une quantité d'enzyme telle que la concentration primitive soit de nouveau atteinte, la réaction repart de nouveau (voir fig. 2). Bien que cet effet soit beaucoup moins marqué pour l'amylopectine que pour l'amylose, il n'est pas négligeable. Le phénomène de vieillissement est, d'une manière générale, un phénomène d'agrégation conduisant finalement à une cristallisation ou à une gélatinisation qui est une forme de la

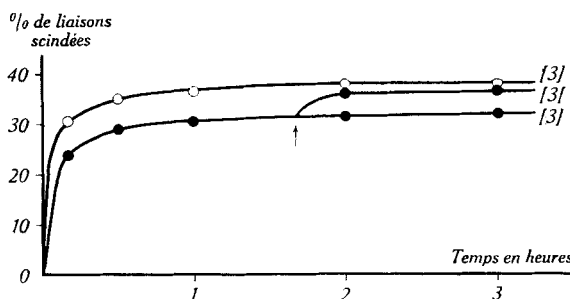


Fig. 2.

Dégradation par l' α -amylase de pancréas de porc de

- l'amylopectine de p. de t. (d.p. 1100),
- l'amylopectine de maïs (d.p. 280),
- [3] concentration d'enzyme,
- ↑ = rajeunissement.

¹⁾ K. H. Meyer & G. C. Gibbons, *Helv.* **33**, 213 (1950).

²⁾ R. B. Alfin & M. L. Caldwell, *Am. Soc.* **71**, 128 (1949).

cristallisation¹⁾. Comme l'amylopectine peut former des gels composés de micelles en frange et former des grains cristallisés, il n'est pas étonnant que ces solutions subissent le phénomène de vieillissement. Nous tenons à souligner ceci, car *Bernfeld*²⁾ et *Myrbäck*³⁾ n'ont pas observés ce phénomène.

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

Nous avons trouvé en outre que les concentrations en enzyme capables de dégrader entièrement l'amylose de maïs d'un degré de polymérisation de 250 ne provoquaient pas une dégradation de l'amylopectine de maïs (d. p. 280) supérieure à 38 % des liaisons glucosidiques, malgré plusieurs rajeunissements (voir fig. 2). Par contre, en augmentant très fortement la concentration de l'enzyme, on arrive en une fois à un palier de 50 à 55 % de liaisons scindées (voir fig. 3 et 4). Comme dans le cas de l'amylose, le palier dépend donc de la concentration en enzyme. Il est en outre moins élevé pour l'amylopectine de pomme de terre d'un degré de polymérisation de 1100 que pour l'amylopectine de maïs d'un degré de polymérisation de 280. Enfin, l'amylopectine de pomme de terre est seul à contenir de l'acide phosphorique (environ 0,08 % P), groupes limitant la dégradation et influençant ainsi la hauteur du palier.

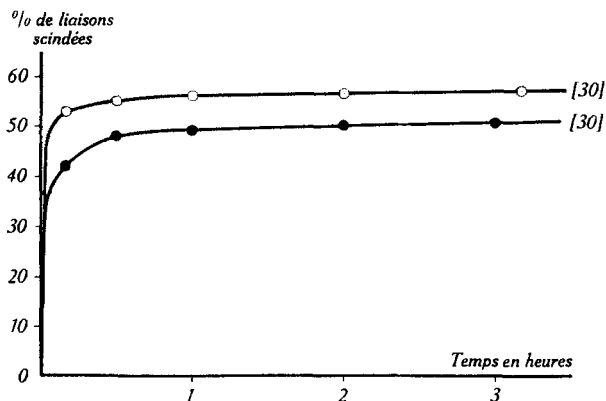


Fig. 3.

Dégradation par l' α -amylase de pancréas de porc de

- l'amylopectine de p. de t. (d.p. 1100),
- l'amylopectine de maïs (d.p. 280),
- [30] concentration d'enzyme.

¹⁾ K. H. Meyer & A. J. A. van der Wyk, *Helv.* **20**, 1331 (1937); K. H. Meyer, P. Bernfeld, R. A. Boissonnas, P. Gürtler & G. Noelting, *J. Phys. Coll. Chem.* **53**, 319 (1949).

²⁾ P. Bernfeld & H. Studer-Pécha, *Helv.* **30**, 1904 (1947).

³⁾ K. Myrbäck, *Arkiv Kem. Mineral. Geol.* **26 A**, N° 7 (1949).

La vitesse d'hydrolyse est donc fortement influencée par la concentration de l'enzyme, même à des concentrations d'enzyme très élevées et en particulier dans les stades avancés d'hydrolyse. Ceci prouve qu'on est encore loin du point où tout le substratum est fixé par l'enzyme. Nous pouvons donc attribuer la différence des vitesses de dégradation de l'amylose et de l'amylopectine à l'affinité plus faible de l'enzyme pour cette dernière. Celle-ci est probablement due à l'agrégation des molécules d'amylopectine entre elles, peut-être aussi à un effet stérique des molécules ramifiées.

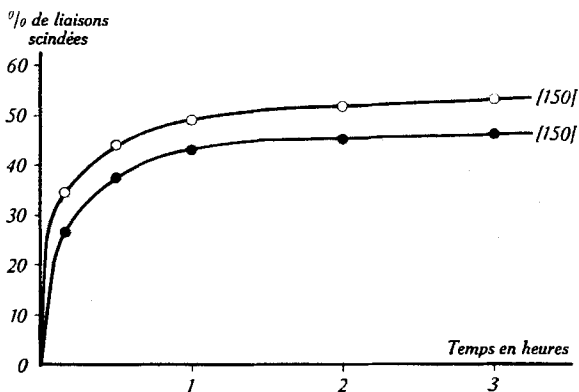


Fig. 4.

Dégradation par l' α -amylase de malt de
 —●— l'amylopectine de p. de t. (d.p. 1100),
 —○— l'amylopectine de maïs (d.p. 280),
 [150] concentration d'enzyme.

L'affinité pour les oligosaccharides ramifiés est encore beaucoup plus petite: avec l'amylase de pancréas de porc, la vitesse initiale de dégradation de l'amylopectine de maïs (concentration enzymatique [3]) correspond à une hydrolyse de 7% par minute. Au contraire, une dextrine (provenant de la même amylopectine) d'un degré de polymérisation 12 a été attaquée dans les mêmes conditions 500 fois plus lentement (dégradation de 2% en 150 minutes). Une différence encore plus marquée est observée avec l' α -amylase de malt. Ces résultats sont donc analogues à ceux obtenus avec l'amylose.

Pour l'amylose, une augmentation de la concentration en enzyme influence principalement le cours de la réaction en diminuant fortement le vieillissement. Pour l'amylopectine, où le vieillissement est moins important, une augmentation de la concentration d'enzyme influence le cours de la réaction en diminuant la différence d'affinité de l'enzyme pour les fragments de poids moléculaire différent, rapprochant ainsi la dégradation enzymatique à une dégradation monomoléculaire.

L'affinité de l' α -amylase de pancréas pour les oligosaccharides ramifiés est plus petite que pour les oligosaccharides linéaires. Nous devons attribuer cette différence à un effet stérique des oligosaccharides ramifiés. Au cours de la dégradation de l'amidon (mélange d'amylopectine et d'amylose) les oligosaccharides linéaires seront donc plus rapidement détruits que les oligosaccharides ramifiés. Ceci est en accord avec les importantes recherches de *Myrbäck*¹⁾ et ses élèves sur la nature chimique des dextrines résiduelles de l'amidon: elles sont ramifiées.

4. L'inhibition par le maltose.

L'inhibition par le maltose est non compétitive et elle est analogue à l'effet d'une diminution de la concentration en enzyme; elle se manifeste aussi lors de la dégradation de l'amylopectine. Ceci permet encore d'expliquer le fait bien connu que l'amidon est plus complètement dégradé par les amylases en présence de levure éliminant le maltose. Nous avons constaté le même phénomène pour les amylopectines de pomme de terre et de maïs et pour nos deux amylases (voir tableau I).

Tableau I.

Influence de l'élimination du maltose sur la dégradation α -amylolytique.

	hydrolysé en heures		fermenté en heures	dextrines résid. en %
amylopectine de maïs + α -amylase de panc.	20	action enzym. interrompue	20	9,2
amylopectine de maïs + α -amylase de panc. + levure	20			5,8
amylopectine de p. d. t. + α -amylase de malt	20	action enzym. interrompue	20	14,8
amylopectine de p. d. t. + α -amylase de malt + levure	20			9,3

5. Les produits d'hydrolyse de l'amylopectine.

Les produits d'hydrolyse ont été analysés par la méthode de fermentation sélective. On trouve au début des dextrines et peu de maltose, puis la quantité des dextrines diminue, ainsi que leur degré de polymérisation, le maltose augmente et le glucose apparaît en quantité appréciable. Le tableau II montre que la composition du mélange dépend principalement du degré d'hydrolyse, tout comme pour l'amylose. A la fin de l'hydrolyse on trouve 8,3 % de «dextrines»

¹⁾ *K. Myrbäck, B. Örtengren & K. Ahlborg, Bioch. Z. 307, 53 (1940); K. Myrbäck & K. Ahlborg, Bioch. Z. 307, 69 (1940); K. Myrbäck, Advances in Carbohydrate Chem. 3, 251 (1948).*

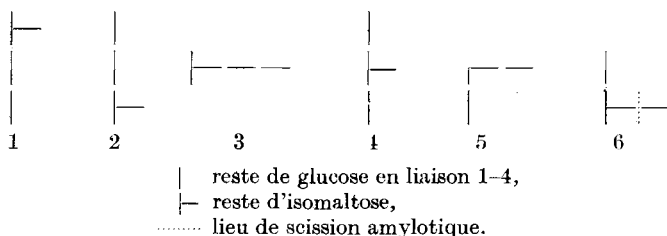
d'un degré de polymérisation moyen de 2,2. Elles consistent principalement en un disaccharide difficilement fermentescible qui ne peut être autre chose que de l'isomaltose. A part celui-ci, nous trouvons 73 % de maltose et pas moins de 18 à 19 % de glucose au lieu des 13 % que l'on trouve à la fin de la scission enzymatique de l'amylose. Ceci provient sans doute de la structure ramifiée de l'amylopectine.

Tableau II.

amylpectine de	dégr. par α -amylase de	degré de scission en %	gl. en %	malt. en %	dext. en %	degré de polym. des dextrines
p.d.t.	malt.	46	10,4	64,8	24,8	8,7
p.d.t.	pancreas	50	12,8	68,2	19,0	6,2
maïs	malt.	54	13,5	70,3	16,2	2,8
maïs	pancréas	58	18,5	73,2	8,3	2,2

En ce qui concerne les 0,4% de restes de glucose de l'amylopectine de pomme de terre qui sont phosphorylés en position 6, selon *Posternak*¹⁾, nous ne les avons pas recherchés dans les produits d'hydrolyse. *Posternak* a retrouvé tout le phosphore sous forme de tétrasaccharides phosphorylés, mais il nous semble probable qu'une dégradation plus poussée nous conduirait au glucose ou au maltose phosphorylés.

Si notre théorie de l'attaque α -amylatique est valable pour l'amylopectine, les longues branches de l'amylopectine donneront pratiquement les mêmes résultats que l'amylose; mais les parties où se trouvent les embranchements réagiront d'une autre façon; on obtiendra des oligosaccharides, tri- et tétrasaccharides ramifiés dont la présence dans les dextrines non fermentescibles a été constatée par *Myrbäck*²⁾. Tandis que le maltotétraose (seul tétraose se trouvant parmi les produits de scission de l'amylose) est scindé en deux molécules de maltose, les tétraoses ramifiés renfermant les points d'embranchement seront scindés d'après le schéma suivant:



1, 2 et 3 donnent du maltose et de l'isomaltose; 4, 5 et 6 donnent deux restes de glucose et un d'isomaltose. La quantité de glucose dans les produits de scission se trouvera ainsi augmentée.

¹⁾ *Th. Posternak*, *Helv.* **18**, 173 (1935).

²⁾ K. Myrbäck, B. Örténblad & K. Ahlberg, Bioch. Z. **315**, 240 (1943); B. Örténblad & K. Myrbäck, Bioch. Z. **303**, 335 (1940).

*Hopkins*¹⁾ s'est demandé si les α -amylases sont capables de scinder les liaisons glucosidiques 1-6 de l'amidon. Nos résultats permettent de trancher cette question. Ainsi qu'il est mentionné plus haut, nous trouvons, à la fin des réactions, environ 8% d'isomaltose, ce qui correspond, dans les limites d'erreur, au 4,2% de restes glucosidiques portant un embranchement dans l'amylopectine. Les liaisons 1-6 ne sont donc pas scindées par les α -amylases ni dans l'amylopectine, ni dans ses produits de dégradation α -amylatiques. Pour vérifier ces conclusions, nous avons fait réagir les α -amylases sur l'isomaltose synthétique. Celui-ci s'est montré complètement résistant à l'attaque de ces enzymes.

6. La dégradation de l'amidon par les α -amylases.

On peut admettre que les réactions d'hydrolyse de l'amylose et de l'amylopectine se superposent simplement lors de la dégradation de l'amidon, pourvu que celui-ci se trouve véritablement en solution. Le vieillissement, la diminution de l'affinité pour le substratum au cours de la dégradation, et l'inhibition par le maltose détermineront l'allure de la réaction. La composition du mélange réactionnel dépend principalement du degré d'hydrolyse atteint, comme l'a indiqué *Somogyi*²⁾. Pourtant, selon la composition de l'amidon, le poids moléculaire de ces constituants, la nature et la concentration de l'enzyme utilisé, la composition du mélange peut varier. Comme on l'a vu, la concentration de l'enzyme et le rapport: affinité pour les polysaccharides/affinité pour les dextrines, influencent l'homogénéité du mélange (§ 2 du travail précédent). Or, ce rapport n'est pas encore connu pour toutes les amylases.

Mais il y a encore d'autres facteurs qui influencent la composition du mélange, notamment le vieillissement. En cas de vieillissement, les polysaccharides supérieurs seront en grande partie soustraits à l'attaque. Pour pousser la dégradation jusqu'au point achromatique (absence de coloration avec l'iode), il faut alors prolonger l'hydrolyse.

*Hanes*³⁾ a trouvé que, si la concentration de l'amidon est augmentée, le point achromatique n'est atteint qu'après une hydrolyse plus poussée. Nous pouvons attribuer ce résultat au fait qu'une solution plus concentrée rétrograde (vieillit) plus facilement et que les particules rétrogradées sont tellement résistantes qu'une hydrolyse prolongée est nécessaire pour les détruire.

Tous les phénomènes d'hydrolyse seront encore beaucoup plus complexes lors de la dégradation d'un empois technique; en effet, ces empois contiennent des grains gonflés ou du moins des fragments de grains. La réaction enzymatique se poursuit donc dans un système

¹⁾ *R. H. Hopkins*, *Advances in Enzym.* **6**, 389 (1946).

²⁾ *M. Somogyi*, *J. Biol. Chem.* **134**, 301 (1940).

³⁾ *C. S. Hanes & M. Cattle*, *Proc. Roy. Soc. London* **125 B**, 387 (1938).

hétérogène; les molécules en solution seront beaucoup plus vite attaquées que celles dans les particules en suspension. Il n'est donc pas possible de donner un schéma général pour toutes les réactions effectuées industriellement. Chaque prescription doit être étudiée séparément si on veut connaître le cours exact des différentes réactions en jeu.

Partie expérimentale.

1. *Préparation des enzymes et dosages d'activité*: voir le travail précédent.

2. *Conditions de réaction*: Toutes les dégradations enzymatiques s'effectuent au thermostat à 20° et au pH optimum d'activité de chaque 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 Na 0,16 M.

3. *Préparation de l'amylopectine*: Les amylopectines de pomme de terre et de maïs sont préparées d'après la prescription de Meyer & Rathgeb¹⁾ et purifiées d'après une méthode nouvelle²⁾.

1 g d'amylopectine est dissous sous forte agitation dans 250 cm³ d'eau distillée à 90°. Après 30 min. on laisse refroidir, centrifuge à 3000 t/min. pendant 10 min., décante et ramène le volume de la solution à 250 cm³. Sa teneur exacte en amylopectine est déterminée après hydrolyse acide par dosage du glucose formé. La concentration est comprise entre 0,32 et 0,38%.

4. *Dégradation de l'amylopectine en présence de levure*: A 30 cm³ d'une solution d'amylase (concentration [3]), tamponnée au pH optimum, on ajoute 250 cm³ de la solution d'amylopectine et 20 cm³ d'une suspension épaisse de *Saccharomyces Chodati*. Le mélange est maintenu sous agitation lente. Après 20 h. on centrifuge à 3000 t/min. pendant 10 min., filtre et met la solution au bain-marie pendant 10 min.

Des essais parallèles sont effectués sans levure. Après 20 h. la réaction enzymatique est interrompue en portant la solution 10 min. au bain-marie. Les sucres sont alors fermentés d'après la méthode décrite ci-dessus.

Les pourcentages des dextrines résiduelles, déterminés après hydrolyse acide, sont donnés dans le tableau I.

5. *Action des α -amylases sur l'isomaltose*: A 10 cm³ d'une solution d'amylase (concentration [3]), on ajoute 10 cm³ d'une solution contenant 50 mg d'isomaltose. On dose immédiatement le pouvoir réducteur, puis après 2, 4, 6, 8, 24, 48 et 72 h. Le pouvoir réducteur à peine accru au début de la réaction par l'hydrolyse de traces d'oligo-saccharides contenues dans l'isomaltose reste constant après quelques heures.

RÉSUMÉ.

1. Nous avons étudié la dégradation de l'amylopectine de maïs (degré de polymérisation d'environ 280) et de pomme de terre (degré de polymérisation 1100) par l' α -amylase de pancréas de porc cristallisée et celle de malt.

2. La dégradation de l'amylopectine est plus lente que celle de l'amylose; le vieillissement et la diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat influencent le cours de l'hydrolyse. Cependant, l'influence du vieillissement est beaucoup moins importante que dans le cas de l'amylose; les paliers observés sont donc dus à la faible affinité de l'enzyme pour les dextrines.

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

²⁾ K. H. Meyer & G. C. Gibbons, *Helv.* **33**, 210 (1950).

3. Aux fortes concentrations d'enzyme on obtient d'un seul coup une dégradation correspondant à la scission de 55 % des liaisons glucosidiques de l'amylopectine de maïs et de 50 % de l'amylopectine de pomme de terre qui contient 0,4 % de restes de glucose-6-phosphate.

4. Les produits finals de dégradation d'une amylopectine renfermant environ 4 % de groupes terminaux sont formés d'environ 19 % de glucose, 73 % de maltose et 8 % d'isomaltose.

5. Les liaisons 1-6 ne sont pas scindées par les α -amylases.

6. Lors de la dégradation d'une solution d'amidon, les phénomènes observés pour l'amylose et l'amylopectine se superposent. La dégradation de l'empois se complique par la présence de fragments de grains non dissous.

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

34. Purification et cristallisation de la β -amylase de malt.

Sur les enzymes amylolytiques XVI¹⁾

par Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer et A. Piguet.

(21 XII 1950).

En 1833, *Payen & Persoz*²⁾ découvraient dans le malt un ferment amylolytique qu'ils purifiaient par des précipitations alcooliques et qu'ils appelaient «diastase». *Schwarzer*³⁾ notait en 1870 que la quantité des sucres formés lors d'une dégradation de l'amidon par «l'amylase de malt» est plus faible si l'on opère à une température supérieure à 60°. Il observait en même temps l'apparition d'un trouble dû à une coagulation de protéines.

En 1878, *Märcker*⁴⁾ émettait l'hypothèse de l'action simultanée de deux enzymes. En reconsidérant le fait qu'une élévation de la température entraîne une désactivation partielle de l'enzyme, *Bourquelot*⁵⁾ admettait que «l'amylase de malt» était en réalité composée de deux ou de plusieurs enzymes différents qui seraient successivement détruits. Cette hypothèse fut expérimentalement vérifiée par *Wijsman*⁶⁾ qui démontra par des essais de diffusion dans des plaques

¹⁾ Précédente communication *Helv.* **33**, 1064 (1950).

²⁾ *J. B. Sumner & G. F. Somer*, *Chem. and Methods of Enzymes*, New York 1943.

³⁾ *A. Schwarzer*, *J. pr. Ch.* **1**, 212 (1870).

⁴⁾ *M. Märcker*, *C.* **1878**, 559.

⁵⁾ *E. Bourquelot*, *C. r.* **104**, 576 (1887).

⁶⁾ *M. H. P. Wijsman*, *R.* **9**, 1 (1890).