

Zeitschrift: Bulletin de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 16 (1924)

Artikel: Contributions au problème de l'amidon
Autor: Philia, M. Meliton
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099621>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 17.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

CONTRIBUTIONS AU PROBLÈME DE L'AMIDON

par M. Meliton PHILIA

PREMIÈRE PARTIE.

ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ DES AMIDONS A L'ÉGARD DE L'AMYLASE D'ORGE.

1. Les Amidons.

Les amidons que nous avons employés sont : le blé, le riz, la pomme de terre, l'arrowroot. Nous avons obtenu ces quatre amidons très purs de la maison Siegfried, à Zofingue. Nous avons préparé nous-mêmes les amidons de haricot et d'orge de la manière suivante : nous avons pris une quantité suffisante de semences de haricot et d'orge pour que la matière employée soit la même au cours de toutes nos opérations.

Ne disposant pas du matériel nécessaire pour moudre finement, nous nous sommes adressé aux Minoteries de Plainpalais ; nous exprimons ici à la Direction de cet établissement nos remerciements pour sa grande obligeance. La farine obtenue, tant pour l'orge que pour le haricot, est assez grise. Nous avons purifié cette farine par le procédé suivant emprunté à l'Encyclopédie agricole de E. Saillard (p. 302) :

On ajoute à 33 gr. de farine brute, 18 gr. d'eau et ensuite, à l'aide d'un mortier et d'un pilon, on fait un mélange aussi intime que possible. On obtient une pâte homogène, que l'on abandonne à elle-même pendant au moins une demi-heure. Pendant ce temps, le gluten acquiert une plus grande consistance. La pâte est placée ensuite dans un linge *très fin*, sur lequel on fait tomber goutte à goutte une très petite quantité d'eau. En même temps on malaxe par la main sans interruption. On arrive ainsi à entraîner complètement la matière amyliacée qui passe à travers les mailles du linge. Lorsque l'eau qui s'échappe est incolore et limpide, l'opération est terminée, tout l'amidon a passé. Au bout d'un certain temps, l'amidon en suspension dans l'eau qui a suinté, se dépose ; on décante l'eau

puis on sèche l'amidon sur plaque de verre. Cette méthode est la seule qui nous a donné un résultat satisfaisant pour la purification des farines d'orge et de haricot.

2. Préparation des Ferments.

Préparation de l'amylase d'orge.

Nous avons suivi, pour la préparation de la diastase, la méthode indiquée par LINTNER¹; on fait macérer du malt dans une solution alcoolique faible (20%) pendant 48 heures; puis, on précipite par l'alcool à 95° jusqu'à refus; le liquide floconneux est alors filtré sur papier; on recueille le ferment sur le papier avant que ce dernier soit sec. Le séchage se fait en déposant sur plaque de verre le ferment humide. On peut, pour la purification du ferment, le redissoudre dans la solution alcoolique à 20% et le précipiter de nouveau par l'alcool à 95°.

Le ferment ainsi préparé se présente en paillettes brunes qu'on peut conserver sans altération des mois durant. Les proportions à employer sont les suivantes :

Poids du malt	1000 grs.
Volume du liquide de macérat.	5 litres sol. alcoolique 20%.
Durée de la macération	48 heures
Température	18° environ.
Quantité de ferment obtenu: 15 gr.	

Préparation de l'amylase de haricot.

1. Germination des semences de haricot.

On lave à l'eau bouillante le récipient destiné à la germination; on introduit immédiatement de la sciure de bois stérilisée à l'autoclave pendant 20 minutes à la température de 120° C.; avant de disposer en 3 étages les semences dans la sciure, on stérilise l'extérieur des semences par lavage rapide dans la solution de Hg Cl₂ à 2 ‰; cette opération a pour but de détruire les germes (champignons en particulier), dont le développement ultérieur dans la sciure de bois est gênant. Bien naturellement, ces graines ont été rincées à plusieurs reprises dans l'eau stérile pour enlever les der-

¹ Journal Pract. Ch. N. F. 34 (378), 36 (481) (1886) 87

nières traces de Hg Cl₂. On place les grains de haricot par couches alternant avec les couches de sciure. On place le tout à l'étuve (température de 20-25°) pendant 2 à 3 jours ; on arrête la germination avant que la tigelle ne soit trop développée.

Extraction du ferment.

Ces plantules sont lavées dans l'eau stérile, puis égouttées et broyées à la machine à hacher. Le tissu broyé est placé dans un linge (préalablement mouillé par de l'eau stérile), puis exprimé dans la presse à main.

Le jus exprimé est mélangé avec une solution alcoolique à 20% ; 48 heures plus tard, on filtre sur papier pour éliminer les impuretés solides. Le liquide, relativement clair, contient l'amylase de haricot qu'on précipite par addition d'alcool à 95°. On laisse pendant 12 heures la sédimentation se faire ; on décante, puis on filtre ; le ferment reste sur le papier sous forme d'une pâte, qu'on étale sur plaque de verre pour la faire sécher à température ordinaire. L'amylase sèche est prête à servir. Il ne faut en aucun cas pulvériser finement le ferment obtenu, car par augmentation de surface, l'altération par oxydation est plus rapide (méthode R. Chodat). De chacun de ces ferments, on a préparé une quantité suffisante pour pouvoir, pendant toute la durée des opérations, avoir toujours à disposition un ferment qui reste semblable à lui-même.

3. Détermination de la force amylolytique des ferments employés et comparaison du pouvoir saccharifiant des trois diastases employées.

Nous avons suivi les indications fournies par WOHLGEMUTH¹ (p.) 33 pour la mesure de la force d'une amylase.

Nous avons préparé de l'amidon soluble en fausse solution à raison de 2 gr. pour 100 cm³ d'eau ; le ferment (amylase d'orge) a été dispersé (50 mgr. pesés exactement) dans 50 cm³ d'eau ordinaire ; il faut ajouter l'eau petit à petit pour réaliser une bonne dispersion.

On remplit 10 tubes à essais, chacun avec 10 cm³ de la solution d'amidon soluble ; au premier on ajoute cm³ 0,1 de ferment et

¹ WOHLGEMUTH J., Grundriss der Fermentmethoden. Berlin, Springer, 1913.

0,9 cm³ d'eau ; au second cm³ 0,2 de ferment et cm³ 0,8 d'eau ; ainsi de suite : cm³ 0,3 + cm³ 0,7, cm³ 0,4 + 0,6 cm³ 0,5 + cm³ 0,5, cm³ 0,6 + cm³ 0,4, cm³ 0,7 + cm³ 0,3, cm³ 0,8 + cm³ 0,2, cm³ 0,9 + 0,1 cm³ et dans le dixième 1 cm³ de ferment. Tous ces tubes sont portés à la température de 35° pendant une heure. Pour stabiliser la réaction, nous avons plongé tous les tubes à essais pendant 5 minutes dans l'eau bouillante. Nous exprimons le résultat de l'amylolyse par la mesure des sucres réducteurs formés. Les chiffres correspondent au nombre de cm³ de chacune de ces solutions, employés exactement pour décolorer 15 cm³ de la solution de Fehling diluée au 1/12. On obtient ainsi dans :

le tube No 1 :	36,0 cm ³
» » 2.....	32,0
» » 3.....	28,0
» » 4.....	18,4
» » 5.....	13,5
» » 6.....	10,1
» » 7.....	8,9
» » 8.....	6,7
» » 9.....	6,2
» » 10.....	4,4

Avant toute expérience, il était nécessaire de comparer la puissance amylolytique des deux ferments préparés ; nous indiquerons tout de suite dans ce paragraphe la force du ferment de salive. Les ferments d'orge et de haricot sont à la même concentration d'inégale force. Le tableau suivant résume les valeurs respectives des différentes enzymes employées :

	Haricot : 0,3%	Orge : 0,1%	Salive : 1/50					
Milieu eau pH = 7,6	<table border="1"> <tr> <td>Force = 2</td> <td>Force = 2</td> <td>Force = 1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Force = 10</td> <td>Force = 20</td> </tr> </table>	Force = 2	Force = 2	Force = 1		Force = 10	Force = 20	
Force = 2		Force = 2	Force = 1					
	Force = 10	Force = 20						
Milieu phosphates pH = 6,6								

Dispersés dans l'eau de la conduite, les ferments d'orge et de haricot aux concentrations respectives de 0,1% et 0,3% sont deux fois plus actifs que la salive diluée au 1/50 dans ce même milieu.

L'effet de la concentration des ions H sur les actions enzymatiques est un fait pratiquement trop connu pour que nous insistions sur les différences obtenues en fonction du pH du milieu. Néanmoins, signalons qu'après avoir opéré avec des ferments dispersés dans l'eau ordinaire, nous avons employé les mêmes ferments, mais dispersés dans un milieu aqueux de réaction correspondant à la concentration optimale en ions H pour l'action diastasique. Le pH était ajusté au moyen des solutions de phosphates primaire potassique et secondaire sodique (Sorensen). L'amylase d'orge est 5 fois plus active au pH = 6,6 qu'au pH = 7,6.

L'amylase de salive est 20 fois plus active au pH = 6,6 qu'au pH = 7,6.

Nous tirons de ces chiffres une notion nouvelle relative à la différence entre un ferment naturel (salive) et un ferment dénaturé par précipitation alcoolique. Le ferment naturel, dans ce cas, est beaucoup plus sensible aux variations du pH que le ferment obtenu par précipitation alcoolique.

4. Préparation des empois d'amidon, de blé, riz, arrowroot et de pomme de terre.

Nous avons pris 3 grammes de chacun de ces amidons et nous les avons délayés dans 30 cm³ d'eau ordinaire.

1. *Dispersion*. — On observe tout d'abord qu'au point de vue de la sédimentation, l'amidon de pomme est celui qui tombe le plus rapidement au fond du tube ; puis vient l'amidon d'arrowroot, puis celui de blé, puis celui de riz ; la sédimentation de ce dernier est presque nulle. Corrélativement, l'opacité des liquides surnageants suit l'ordre inverse ; la suspension de riz est la plus trouble, puis vient celle de blé, puis celle de l'arrowroot ; le liquide surnageant le sédiment de pomme de terre est parfaitement limpide.

2. *Empois*. — Ces dispersions d'amidons ont été diluées par 60 cm³ d'eau ordinaire et chaque flacon a été chauffé jusqu'à l'ébullition. Ces amidons différents ont passé à l'état d'empois. On observe alors que l'empois de blé est le plus trouble, puis vient l'empois de riz, puis celui d'arrowroot, puis l'empois de pomme de terre qui était le plus clair.

La coloration par l'iode de ces différents empois a donné les résultats suivants :

10 cm ³ empois	}	+ 1 goutte Lugol	riz → incolore.
		+ 1 goutte Lugol	blé → coloration faible
		+ 1 goutte Lugol	arrow. → coloration bleue.
		+ 1 goutte Lugol	Pomme d. t. → coloration bleu-foncé
10 cm ³ empois	}	+ 2 gouttes Lugol	
		+ id.	riz → violet-rouge (No 567) ¹
		+ id.	blé → violet (No 508)
		+ id.	arrow. → bleu (No 401).
		+ id.	pomme d. t. → bleu foncé (No 406).

5. Etude par la réaction à l'iode de la saccharification des différents empois d'amidons.

Les quatre empois étant préparés, on ajoute à chaque flacon Erlenmeyer contenant 40 cm³ d'empois, 1 cm³ de ferment d'orge à 0,1% (préparation dans l'eau ordinaire), puis on porte les flacons à l'étuve : température de 35° C. Au bout de 15 minutes, on prélève quelques cm³ dans chaque tube à essais ; ces échantillons sont examinés par la coloration à l'iode.

<i>Echantillons d'empois de:</i>	Après 15'	Après 30'	Après 48 heures
Riz	Violet rouge	Violet	Rouge Bordeau
Blé	Violet	Violet bleu, tirant sur le rouge	Rouge plus clair
Arrowroot	bleu	bleu	Bleu
Pomme d. t.	bleu foncé	bleu	Incolore

En résumé : au cours de l'amylolyse,

le riz donne le plus vite, et puis le plus nettement ensuite, la coloration rouge de l'iode (amylopectine).

¹ Les numéros accompagnant l'indication des colorations, correspondent au Code International des couleurs publié par Klincksiek, Paris.

Le blé se comporte de même, quoique d'une façon moins accentuée.

La pomme de terre donne la plus forte coloration bleue de l'iode (amylose). mais,
l'*Arrow-root* garde cette coloration bleue de l'iode (amylose) plus longtemps.¹

Tandis que l'observation microscopique révèle chez les amidons de plantes diverses une multiplicité de formes par lesquelles il est le plus souvent aisé de reconnaître l'origine d'une fécule quelconque, les expériences des chimistes modernes semblent aboutir à considérer l'amidon comme constitué d'une substance hydrocarbonée fondamentale. Nous avons en vue les travaux de Pringsheim, Pictet, Karrer, Irving et leurs collaborateurs. Sans vouloir entrer ici en discussion sur les opinions divergentes relatives à la nature de la substance fondamentale, hexosane ou maltosane, diamylose ou triamylose (l'amylose étant considérée comme anhydride du maltose), nous dirons que tous ces beaux travaux concordent en ce point que la substance fondamentale ne peut être de nature diverse. C'est d'ailleurs une conclusion à laquelle amenaient déjà les recherches des enzymologues qui obtenaient comme produit ultime de l'action de l'amylase sur l'amidon le maltose et seulement ce dissaccharide.

Mais depuis Naegeli, on a distingué dans les produits de polymérisation de cette ou de ces substances fondamentales (substances chimiques définies) des sucrosanes de deux natures qui ont reçu des noms différents, mais que depuis les travaux de Maquenne, on convient de nommer l'une *Amylose*, polysaccharide qui ne fournit pas d'empois et qui donne, avec la solution de Lugol, une belle coloration bleue, l'autre *Amylopectine*, polysaccharide qui fournit l'empois d'amidon en présence de l'eau bouillante et qui sous l'action du réactif iodé se colore en rouge pourpre. La proportion dans laquelle ces deux catégories de polysaccharides entrent dans la composition de chaque espèce d'amidon ou même d'une seule espèce, n'a jamais été exactement définie, vu la difficulté qu'il y a de séparer nettement ces colloïdes l'un de l'autre.

¹ R. CHODAT (avec la collaboration de J.-W. ROSS et M. PHILIA). — *Sur la spécificité des amidons*. Comptes-rendus. Soc. de physique et d'histoire naturelle de Genève. Archives des Sociétés physiques et naturelles, Genève (1924) Avril-Juillet (page 124).

Dans nos recherches, nous avons fait l'hypothèse de travail suivante : ces proportions varient non seulement, d'amidon à amidon, mais aussi le mode physique d'agencement de ces constituants de l'amidon natif, diffère d'espèce à espèce végétale. De là, la multiplicité des amidons résultant de la nature et du degré de la polymérisation. Dès lors, la spécificité des amidons pour être d'une autre nature que celle des protides (chez lesquels les peptides sont variés tant au point de vue du nombre que de la qualité), n'est pas sans analogie avec celle de ces derniers.

Cela se voit tout d'abord à l'inégale résistance des amidons vis-à-vis de l'attaque par une même amylase. Nous avons préparé cette dernière en quantité suffisante pour pouvoir, à chaque moment et pour chaque expérience, employer à la même concentration un même ferment. Les amidons étudiés ont été Riz (*Oryza sativa*), Blé (*Triticum vulgare*), Pomme de terre (*Solanum tuberosum*), Arrowroot (*Maranta arundinacea*). Or, il se trouve qu'en employant une même amylase d'orge, à la même concentration et à la même température, les empois d'amidon préparés de la même manière, sont saccharifiés avec des vitesses différentes : Riz, Blé, Arrowroot, Solanum, ces amidons étant rangés selon la quantité de sucre réducteur obtenue, dans l'unité de temps. Dans une première série, étudiée une fois avec M. J. W. Ross, puis dans une nouvelle série d'expériences, on a déterminé la quantité de sucre à la fin de l'opération.

Dans d'autres essais, on a suivi la saccharification, en fonction du temps 15', 30', 45', 60', 180', etc. L'ordre des amidons cités se maintient durant toute la saccharification, les courbes restant sensiblement parallèles, ce qui indique une inégale résistance des différents amidons, qui reste spécifique, aussi longtemps qu'il reste de l'« amidon » à saccharifier ; le phénomène reste le même dans son essence (mode d'action du ferment), puisque les courbes présentent la même allure.

Si au lieu d'empois d'amidon, on utilise l'amidon soluble correspondant, obtenu par l'action à froid de l'acide chlorhydrique dilué, la marche de l'hydrolyse reste comme nous allons le voir, la même et le rang des amidons reste constant.

6. Préparation des amidons solubles.

On obtient l'amidon soluble en traitant l'amidon cru avec de l'acide chlorhydrique à 7%. Nous avons pris 20 grammes de chaque amidon (Blé, Riz, Arrowroot, Pomme de terre) pour 500 cm³ de la solution acide. La macération a duré une semaine, pendant laquelle on a agité régulièrement les flacons. L'opération est considérée comme terminée lorsque l'examen microscopique révèle que, pratiquement, tous les grains dans chaque solution ont éclaté.

Cet amidon traité est retenu par filtration sur un papier et puis lavé à plusieurs reprises jusqu'à ce que l'eau de lavage n'accuse plus de réaction acide. Pour le sécher, on étale cet amidon soluble sur des plaques de verre. Nous avons observé, lors de l'examen microscopique, que tous les amidons n'avaient pas été altérés d'une manière identique par l'acide. Les grains de l'amidon de Riz étaient les plus disloqués puis, par ordre décroissant d'altération, venaient les amidons de Blé, puis de pomme d. t., puis d'Arrowroot, ce dernier paraissant avoir le moins souffert de l'acide chlorhydrique.

7. Etude de l'amylolyse des différents amidons solubles par la mesure du sucre et la réaction à l'iode.

1. Sucre formé au cours de l'amylolyse.

Nous avons préparé de l'amidon soluble à 2% de diverses provenances ; en chauffant, ces amidons se dispersent bien dans l'eau, sans donner d'empois ; nous avons néanmoins constaté des différences dans la fluidité de ces préparations.

Le plus fluide de ces liquides est celui provenant de l'amidon soluble de Pomme d. t., puis viennent celui d'Arrowroot, puis celui de Blé, puis celui de Riz. A 200 cm³ de chacune de ces 4 fausses solutions, nous avons ajouté 20 cm³ de la solution d'amylase d'orge fraîchement préparée (0,1%). Nous donnons ici le résultat de la saccharification en indiquant le nombre de cm³ qu'il a fallu employer de chaque échantillon prélevé à un moment donné de l'hydrolyse, pour décolorer exactement 10 cm³ de la solution de Fehling diluée au 1/6.

Pour décolorer 10 cm³ de liqueur de Fehling (1/6), il faut :

<i>Temps</i>	<i>Cm³</i>	<i>Echantillon de :</i>
après 15'	7,6	Riz
	8,2	Blé
	9,8	Arrowroot
	10,0	Pomme de terre
après 30'	4,6	Riz
	5,0	Blé
	8,0	Arrowroot
	6,0	Pomme de terre.
après 45'	2,8	Riz
	3,8	Blé
	6,8	Arrowroot
	4,6	Pomme de terre.
après 2 h. 30	1,4	Riz
	2,0	Blé
	3,2	Arrowroot
	2,8	Pomme d. t.
après 3 h. 30	1,4	Riz
	2,0	Blé
	3,2	Arrowroot
	2,6	Pomme d. t.

2. Colorations obtenues par l'iode au cours de l'amylolyse.

On prépare 4 fausses solutions d'amidon soluble à 2% en chauffant un peu ; on porte 200 cm³ de ces liquides d'amidon soluble à la température de 38 à 40° C., puis, à ce moment, on ajoute à chaque flacon 5 cm³ d'une fausse solution d'amylase d'orge fraîchement préparée au titre 0,1%. L'amylolyse se poursuit alors à la température de 38 à 40° C. La viscosité des quatre liquides diminue, mais l'ordre demeure à peu près le même : Pomme de terre le plus fluide, puis Arrowroot, puis Riz et enfin Blé. Il faut remarquer que le liquide Riz a été plus attaqué par le ferment et qu'il a changé de place par rapport au liquide Blé.

Pour l'examen à l'iode, on prélève un échantillon de quelques cm³ dans la masse en digestion ; à cette petite quantité, on ajoute

3 gouttes de la solution de Lugol (liqueur de Graham) et l'on observe les colorations apparues.

<i>Tableau des teintes</i>				
10 cm ³ --> <i>Echantillons de :</i>				
après :				
	Riz	Blé	Arrowroot	Pomme
15'	+ 3 Lugol → <i>rose</i> Code ; 3. A. NB. La solution se décolore ; on ajoute encore 4 gtte Lugol ; se décolore de nouveau.	+ 3 Lugol → <i>rose</i> Code : 21-22	+ 3 Lugol → <i>bleu-violet</i> Code : 461	+ 3 Lugol <i>bleu-violet</i> Code : 451
30' Tout est bc. + fort	<i>rouge-rose</i> Code : 12 NB. Se décolore un peu.	<i>rouge-foncé violacé</i> Se décolore un peu. Code : 12-13.	<i>bleu</i> Code : 426	<i>bleu</i> Code : 427.
45' et 60' idem mais + fort				
15 heures	+ 2 gttes Lugol <i>vieux-rose</i>	+ 2 gouttes de Lugol <i>vieux-rose</i>	+ 2 gouttes de Lugol ; <i>traces de bleu</i> seul ^t sur les flocons !	+ 2 gouttes Lugol <i>incoloré</i> + 7 gouttes pas de coloration

Remarques :

1. Il faudrait déterminer quel est l'agent qui, dans le liquide du blé et du riz, agit comme décolorant ;
2. La dilution par l'eau est sans effet sur la teinte ;
3. L'addition d'acide acétique n'amène aucun changement aux couleurs.

Une seconde expérience de ce type a été entreprise dans les conditions suivantes :

Les solutions d'amidon soluble de Blé, Riz, Arrowroot et Solanum (2%) sont distribuées (200 cm³ de chacun) dans 4 Erlenmeyers ; à

chacun de ces derniers on ajoute, quand la température y a atteint 38 à 40° C., 20 cm³ de ferment amylase d'orge à 0,1%. Le prélèvement des échantillons 10 cm³, s'est fait au bout des temps suivants : 15', 30', 45', 60', 90', 120', 3 heures, 3 h. 1/2, 15 h. 1/2. Chaque prise de 10 cm³ est bouillie quelques minutes pour stabiliser la réaction.

Remarquons qu'avant l'intervention du ferment, l'ordre de la viscosité comparée de ces quatre liquides était le suivant : Pomme de terre le plus fluide, puis Arrowroot, puis Blé, puis Riz. Le liquide du Blé change de place au cours de l'amylolyse, c'est-à-dire qu'il devient plus fluide que le liquide du Riz.

Donc, si on suit au moyen du réactif iodé le degré de dépolymérisation par l'amylase, le groupement des amidons se maintient.¹ Tandis que l'empois d'amidon de *Solanum* et d'Arrowroot, sous l'action de l'amylase d'orge, fournissent rapidement une liquéfaction avec une coloration bleu pur par l'iode, ceux de Riz et de Blé, dans les mêmes conditions d'expérience, fournissent une liquéfaction avec coloration en vieux-rose ou en rose-pourpre, caractéristique pour chaque amidon. Et cette différence se maintient au cours de la durée totale de la dépolymérisation, laquelle se continue parallèlement avec la saccharification, les colorations restant si spécifiques qu'il est possible, par cette méthode, de dire, à chaque moment, à quel amidon on a affaire.

C'est comme si, dans la première catégorie, il restait, jusqu'au bout, un excès d'amylose déterminant la couleur exclusivement bleue (en présence de la solution iodée), tandis que dans le second cas l'amylopectine prépondérante imposait sa colorabilité spécifique. Cette spécificité se maintient si, au lieu des empois, on utilise des fausses solutions d'amidon soluble correspondant. Et cependant, dans ces derniers, l'amylopectine a disparu, puisque ces amidons solubles ne fournissent plus d'empois. L'amylopectine, selon Samec et Mayer², serait un éther phosphatique de l'érythroamylose. Ces auteurs ont même annoncé qu'ils avaient réalisé la synthèse de l'amylopectine par une éthérification de l'érythroamylose et de l'acide phosphorique. En effet, les amidons solubles de *Solanum* et d'Arrowroot donnent, au cours de leur dégradation par l'amylase

¹ R. CHODAT (avec la collaboration de J.-W. ROSS et M. PHILIA. — *Sur la spécificité des amidons*. Compte rendu des séances de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève. Vol. 41, N° 2, Avril-Juillet 1924.

² SAMEC et MAYER. *Kolloidchem. Beiheft.*, 13 (1920) et 16 (1922).

<i>Teintes des Echantillons (10 cm³)</i> après addition de 3 gouttes de Lugol				
<i>Prélevés après :</i>	Riz	Blé	Arrowroot	Pomme d. t.
15'	<i>rose</i> Code : 3 A <small>La solution se décolore, il faut ajouter une 3^{me} goutte pour que la coloration revienne.</small>	<i>rose-sale</i> Code: 21-22	<i>bleu-violacé</i> Code: 461	<i>bleu-foncé</i> Code: 451
30' tout est + fort	<i>rouge-rose</i> Code : 12 <small>Se décolore un peu.</small>	<i>rouge-foncé et violacé.</i> <small>devient vieux rose</small>	idem. mais beaucoup plus foncé Code: 426	Code : 427
45' et 60'	idem.	idem.	idem.	idem.
Mais, un peu plus pâle.				
90'	idem.	idem.	idem.	idem.
2 hs. 3 hs.	idem.	idem.	idem.	idem.
12 heures	+ 2 gttes Lugol <i>rose pâle</i> + 5 gttes Lugol <i>vieux-rose</i>	+ 2 gttes. de Lugol <i>faible rose</i> + 5 gttes Lugol <i>vieux-rose</i>	+ 2 gttes de Lugol <i>traces de bleu,</i> seulement visible sur les flocons. + 5 gttes de Lugol <i>traces de bleu</i> assez visibles sur les flocons	+ 2 gttes. de Lugol <i>pas de coloration</i> + 5 gttes. de Lugol <i>décoloration</i> + 7 gttes, <i>pas de coloration.</i>

N. B. — Il faut remarquer que les échantillons d'amidon soluble de riz, hydrolysés pendant 15', 30', 45', 3 heures et traités ensuite au Lugol, se décolorent tous au bout de deux heures. Les échantillons de Blé, restent eux tous roses, sauf celui qui n'a été hydrolysé que 15'. Donc, le corps, facteur de décoloration, est rapidement détruit chez le Blé (au minimum 15') tandis qu'il demeure encore agissant dans l'empois de Riz qui a été hydrolysé 3 heures durant.

d'orge, jusqu'à la formation définitive de produits non colorables, des liqueurs qui se colorent en bleu, l'intensité étant cependant spécifique pour chaque amidon ; tandis que ceux de Riz et de Blé se colorent, dans les mêmes conditions, en vieux-rose ou en rouge-pourpre. Dès lors la spécificité, dans cette dernière catégorie, n'est pas liée à la possibilité de fournir une pectine (gelée), mais à l'existence d'un agrégat fondamental de polysaccharides se colorant en rouge-pourpre par l'iode. Les essais nombreux ont tous été concluants et ont été maintes fois répétés, en changeant aussi les concentrations ou en acidifiant le produit obtenu à l'acide acétique. Leur durée était de 15' à deux jours.

Des différences analogues ont été obtenues lorsqu'on traitait l'amidon, à froid, par la chaux caustique, le chlorure de calcium, la soude caustique diluée ou des mélanges de soude et de chlorure de calcium, réactifs au moyen desquels on cherchait à réaliser, si elle était possible, une tautomérisation des complexes colloïdaux polymérisés. Mais dans ces conditions encore, la spécificité se maintenait et le degré de ressemblance indiqué précédemment pour les divers amidons, restait inaltéré au cours de toute la durée de dépolymérisation.

Il nous paraît résulter de ces recherches que même si les chimistes arrivent à se mettre d'accord (et il n'y a pas lieu de douter que la conclusion ne soit prochaine), sur la nature du ou des corps fondamentaux, constitutifs de tous les amidons, le biologiste et l'enzymologue auront à tenir compte du mode et du degré de polymérisation des deux catégories : amylose et amylopectine (ou érythroamylose) qui déterminent la spécificité des amidons et aussi de leurs substances de base qui montrent déjà cette spécificité.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA FIXATION DES AMYLASES PAR DIFFÉRENTS AMIDONS.

8. Phénomène d'Ambard.

Monsieur L. Ambard a publié, en 1920, une première note ¹ sur le problème de la fixation de l'amylase par l'amidon cru ; d'autres mémoires ² ont été publiés depuis par cet auteur sur la même question. Il ressort, en résumé, des beaux travaux de cet auteur, les faits suivants : lorsqu'on ajoute de l'amidon cru à un liquide contenant de l'amylase, et qu'on agite le tout énergiquement, les grains d'amidon absorbent presque instantanément la totalité du ferment présent ; par centrifugation, on sépare l'amidon cru qui s'est chargé de l'amylase dont il a dépouillé la solution. Ce complexe nouveau, amidon cru-amylase, présente une stabilité telle que des lavages répétés ne réussissent pas à détacher le ferment du grain d'amidon ; la reprise du ferment, ou défixation, suivant l'expression d'Ambard, échoue également en employant des sucres ou des matières colloïdales variées ; cette défixation n'a lieu que si l'on met le complexe amidon cru-amylase en présence d'empois d'amidon, de glycogène ou de-dextrine. Ces phénomènes ont permis à Ambard d'élaborer une « technique générale du dosage de l'amylase par l'amidon cru, technique qui est précise, sûre et rapide. » (loco citato, 1920, p. 51)..

Dans l'article intitulé : « Sur l'amylase. Son dosage. Mécanisme de la digestion amylolytique » ², Monsieur Ambard dit : « ...dans les publications précédentes, nous avons montré que l'amylase agitée en présence d'amidon cru, s'y fixait intégralement et s'y

¹ AMBARD, Léo. C. R. de la Société de Biologie. T. LXXXIII (1920), p. 1458 et T. LXXXIV (1921), p. 230.

² Id : Bulletin de la Société de Chimie biologique. T. III (1921), n° 2, p. 51, et T. X (1923), n° 8, p. 693.

maintenait fixée malgré des lavages ultérieurs à l'eau, qu'en d'autres termes, si l'on compare l'activité amylolytique du culot d'amidon obtenu par centrifugation et chargé de ferment, avec l'activité du même ferment directement porté dans l'empois d'amidon, les résultats obtenus sont identiques aux erreurs d'expérience près.» Encore plus loin, Ambard dit : « ...l'amidon cru fixe la totalité de l'amylase du liquide avec lequel on l'agite. »

Nous avons effectué la fixation de l'amylase d'orge par différents amidons crus en suivant la méthode préconisée par M. Ambard ; nous avons également employé le ferment de haricot et l'amylase de salive. Dans tous ces cas, nous avons pu observer à notre tour, le phénomène découvert par Ambard, c'est-à-dire combinaison entre le ferment et la substance fermentescible ; ce n'est que dans les proportions, entre la quantité fixée et la quantité de ferment demeurée libre, que nos expériences ne se sont pas trouvées conformes avec celles de l'auteur susnommé. En effet, dans aucune de nos nombreuses expériences, l'amylase d'orge n'a été fixée intégralement, totalement, par aucun des divers amidons employés. Nous avons même obtenu, dans des conditions qui seront décrites plus loin, des culots d'amidons crus qui n'avaient fixé que des traces de ferment. On pouvait nous objecter de travailler avec une amylase dénaturée, c'est-à-dire un ferment obtenu par précipitation alcoolique, qui diffère certes beaucoup au point de vue colloïdal d'un ferment naturel, non coagulé puis redispersé. Pour nous mettre exactement dans les conditions réalisées au cours des opérations de M. Ambard, nous avons pris de la salive diluée au 1/50 ; dans ce cas encore, nous n'avons pu observer que la fixation **partielle** de la quantité de l'amylase présente. Nous avons alors demandé à M. Ambard différents détails techniques qu'il nous a très obligeamment envoyés. Nous tenons ici à exprimer à M. L. Ambard notre grand remerciement pour son aimable réponse à notre lettre. De la lettre reçue de M. Ambard, j'extrais les conseils suivants :

1. Il est nécessaire de travailler dans un milieu dont le pH est bien déterminé (optimum : pH = 6.6-6.4).
2. La quantité de ferment présente dans le liquide est importante ; d'autant moins il y aura d'amylase, d'autant mieux elle sera fixée par l'amidon cru.

3. Il est nécessaire de manipuler rapidement et à basse température pour éviter l'attaque de l'amidon cru par le ferment.

4. L'emploi d'amidon cru de riz est préférable, parce qu'il se centrifuge aisément ; tandis que d'autres amidons laissent à la surface du liquide surnageant un film constitué par les plus petits granules.

5. M. Ambard suggère, dans sa très intéressante lettre, certaine explication concernant l'insuccès dans la fixation par les amidons crus d'amylase d'orge. Ce point sera repris plus loin.

Il sera plus simple de consigner ici les expériences que nous avons faites et d'en tirer les conclusions qui pourront éclaircir le problème soulevé et fort avancé par M. Ambard.

9. Technique de la fixation.

Méthode Ambard.

On pèse gr. 0,4 de l'amidon cru, de blé, de pomme de terre, etc. ; cette quantité d'amidon est mise dans un flacon d'Erlenmeyer de 25 cm³, auquel on ajoute 20 cm³ de la solution de NaCl à 2‰ ; il faut introduire¹ alors dans l'amidon délayé 1 cm³ du ferment amylase : orge, haricot ou salive, aux concentrations respectives de 0,1‰, 0,3‰ et 0,2‰. Le flacon Erlenmeyer est agité énergiquement pendant 5 minutes. La suspension est versée alors dans les tubes d'un appareil à centrifuger, capable de faire 3.000 tours à la minutes. En cinq minutes environ, la centrifugation est opérée, c'est-à-dire qu'on a, au bas des tubes, le sédiment blanc de l'amidon et par dessus, le liquide surnageant ; il arrive parfois qu'à la surface de ce dernier demeure une fine couche de poussière d'amidon, la force centrifuge n'ayant pas réussi à faire crever le film de surface à ces petits granules ; ce phénomène se rencontre avec les amidons de Blé, et surtout de Riz et fort peu avec les amidons de Pomme de terre ; et pas du tout avec les amidons de l'Arrowroot, d'Orge et de Haricot. Il suffit alors de chicaner avec une allumette la surface du liquide, de manière à immerger ces grains

¹ N. B. — Monsieur Ambard fait remarquer avec justesse qu'il ne faut pas mettre l'amylase en premier lieu, car l'effet de l'alcali du verre est assez intense pour détruire une partie du ferment porté directement au contact du tube ; au contraire, l'introduction préalable de la solution tampon chlorurée et la dilution elle-même garantissent l'amylase contre l'effet destructif de l'alcali du verre. Ces précautions n'ont de sens que dans le cas où l'on travaille en milieu à pH défini.

d'amidons flottants et de continuer la centrifugation pour purifier le liquide surnageant, qu'on décante et conserve soigneusement. Puis on ajoute, au sédiment d'amidon, la même quantité d'eau salée pour laver l'amidon cru qu'on délaye à nouveau ; une seconde centrifugation permet de séparer l'amidon bien lavé et de recueillir le 2^{me} liquide surnageant pour l'ajouter au premier ; on a ainsi 40 cm³ de liquide surnageant total.

En principe, si la quantité de ferment mis en œuvre n'est pas excessive, la totalité de l'amylase qui se trouvait dans la fausse solution a dû passer sur l'amidon cru par absorption ; tel est le principe d'Ambard.

La défixation.

Pour détacher l'amylase des grains d'amidon, nous avons employé, en général, l'empois d'amidon de pomme de terre à 3% ; dans quelques cas, nous avons utilisé l'empois d'amidon de riz ; il faut noter que ce dernier, dans les mêmes conditions de durée et de température de l'opération, fournit sous l'influence du ferment une quantité plus grande de sucre réducteur que l'amidon de pomme de terre. Aussi, pour que les opérations de défixation soient comparables, faut-il toujours se servir du même empois. La technique a été la suivante : le culot d'amidon, qui a été lavé deux fois, est dispersé dans 40 cm³ de solution saline¹ ; on ajoute 10 cm³ d'empois de Pomme de terre à 3% ; le mélange est agité puis porté à l'étuve pendant deux heures à la température de 37° C. On stabilise ensuite l'opération en portant à l'ébullition tous les flacons Erlenmeyer. La mesure du sucre formé est faite par la réduction de la liqueur de Fehling diluée au 1/6. D'autant plus grand sera le nombre de cm³ de liquide employé pour décolorer exactement 10 cm³ de la solution de Fehling diluée au 1/6, d'autant plus petite sera la quantité de sucre formée ; on en infère que la quantité de ferment était faible et que la fixation sur l'amidon cru avait été médiocre, etc.

¹ Par solution saline, il faut entendre, suivant l'indication fournie pour chaque expérience, tantôt la solution de sel marin à 2‰ (pH = 7,6), tantôt la solution tampon de phosphates ou de glycocolle ou de citrate (pH = 6,6).

10. Examen par la coloration à l'iode de l'empois de Riz, hydrolysé d'une part, par l'amylase fixée sur l'amidon cru et de l'autre, par l'amylase demeurée libre dans le liquide surnageant (fixation).

On procède à la fixation de l'amylase d'orge par les amidons de Blé et de Pomme de terre :

Flacon 1. — gr. 0,5 amidon cru (= amc.) de Blé + 20 cm³ solution NaCl 2 ‰ + 1 cm³ amylase (= amy.) d'orge à 0,1 %.

Flacon 2. — gr. 0,5 amc. pomme de terre (= pomme) + 20 cm³ NaCl 2 ‰ + 1 cm³ amy. orge 0,1 %.

Agiter, centrifuger, séparer par décantation et relaver (voir technique décrite plus haut, p. 12), on a ainsi : pour la Pomme : 40 cm³ de liquide surnageant (= l. s.) et le culot d'amidon (= c) délayé dans 40 cm³ d'eau salée ; pour le Blé, de même, 40 cm³ l. s. et 40 cm³ c. Pour défixer, on ajoute à chacun des quatre flacons : l. s., pomme, c., pomme, l. s., blé, c., blé, 20 cm³ d'empois d'amidon de riz ; après deux heures à l'étuve à 37°, on stabilise la réaction par l'ébullition.

Coloration par la solution iodo-iodurée :

Il faut remarquer que chacun de ces 4 liquides d'hydrolyse de l'empois de riz prend, après addition de quelques gouttes de Lugol, une coloration différente, suivant qu'on décante la partie supérieure du liquide, ou qu'on se sert du liquide agité avec son dépôt.

Le liquide clair, décanté du flacon, donne une coloration générale bleue ; le liquide agité avec son sédiment donne une coloration générale rouge-violacé.

Cela provient, sans doute, que dans les quatre flacons, l'action du ferment s'est manifestée et que l'**amylopectine** (coloration rouge-pourpre à l'iode) s'est sédimentée avec les grumeaux de l'empois, tandis que l'amylose (coloration bleue à l'iode) est demeurée en suspension.

L'expérience peut se résumer dans le tableau suivant :

Fixation de: l' <i>Amylase d'Orge</i> 0,1% par les amidons de:							
<i>Blé</i>				et <i>Pomme d. t.</i>			
Défixation par: l'Empois de Riz (3%).							
10 cc.		10 cc.		10 cc.		10 cc.	
Liquide surnageant				Culot			
Décanté	Agité	Décanté	Agité	Décanté	Agité	Décanté	Agité
+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.	+ Iode 3 gttes.
Bleu avec fins flocons.	Rouge violacé flocons moyens.	Bleu avec fins flocons.	Rouge violacé avec fins flocons.	Bleu avec fins flocons.	Rouge violacé avec flocons grossiers.	Bleu avec grossiers flocons.	Bleuâtre avec teinte violacée.

Cette expérience nous avait paru intéressante à faire à cause de la théorie de la multiplicité des ferments amylases. On aurait pu, en effet, supposer une sorte de dédoublement du ferment par collage sur l'amidon cru du ferment dépolymérisant tandis que le reste du ferment demeurerait dans le liquide surnageant. Or, la méthode de fixation ne révèle rien de semblable, puisque l'attaque de l'empois est la même soit par le ferment fixé sur l'amidon cru, soit par le ferment demeuré dans le liquide surnageant.

SÉRIE A :

Fixations effectuées dans le milieu d'eau ordinaire¹ : pH = 7,6.

Les amidons sont délayés dans l'eau salée à raison de 2 ‰, les amylases dispersées dans l'eau ordinaire et les empois faits avec de l'eau ordinaire.

11. Fixation de l'Amylase d'orge (ferment précipité par l'alcool) par des amidons crus de : Blé, Riz, Pomme de terre, Arrowroot, Orge, Haricot.

La technique employée dans cette opération est la suivante :

On délaye dans 20 cm³ d'une solution de NaCl à 2 ‰, gr. 0,4 de chaque amidon ; à cette suspension, on ajoute 1 cm³ du ferment fraîchement préparé, c'est-à-dire qu'on vient de disperser dans de l'eau ordinaire à raison de gr. 0,1 de la poudre de ferment d'orge pour 100 cm³ d'eau. Le mélange d'amidon et de ferment est agité pendant quelques minutes pour que la fixation ait lieu ; une centrifugation énergique permet de séparer du liquide surnageant — qui est mis de côté — le culot d'amidon cru qu'on délaye à nouveau dans une même quantité d'eau salée ; on décante après centrifugation cette eau de lavage qu'on ajoute aux 20 premiers cm³ ; on a ainsi 40 cm³ de liquide surnageant ; le culot, lavé, est une troisième fois dispersé dans l'eau salée 2 ‰ (40 cm³ cette fois) et ce sol d'amidon représente ce que, dans les tableaux, on nommera : culot.

Au liquide surnageant, comme au culot, sont ajoutés 10 cm³ d'empois d'amidon de pomme de terre pour la défixation qui a lieu pendant 2 heures à la température de 37° C. On stabilise la réaction au bout de ce temps en détruisant le ferment par l'ébullition. La mesure de la quantité de sucres réducteurs formés dans chaque

¹ Lac de Genève.

part, liquide surnageant (L. S.) et culot (C) est fournie par le nombre de cm^3 qu'il faut employer de chacun de ces sols pour réduire exactement 10 cm^3 d'une solution de liqueur de Fehling diluée au 1/6. Les chiffres fournis dans le tableau sont ainsi inversement proportionnels à la quantité de sucres réducteurs présente dans chacun des échantillons.

		Milieu eau : pH = 7,6					
		Amidons de :					
Ferment d' d'Orge à 0,1 %	Liquide surnageant	Blé	Riz	Pomme	Arrowroot	Orge	Haricot
			+ 11 cc * 8 cc *	52 cc.	+ 23,4 * 15,8 *	90,4 cc.	24,4 cc.
	Culot	9,8 cc * 7,4 cc *	∞	22 cc * 15 cc *	∞	∞	∞
		+	—	+	—	—	—

† Les astérisques signifient que l'empois de riz a été employé lors de la défixation.

De ces chiffres, on déduit que dans le milieu d'eau de la conduite, il y a eu fixation *d'une partie* du ferment par les amidons de Blé et de Pomme de terre. Tandis que dans ces mêmes conditions les amidons de Riz, d'Arrow-root, d'Orge et de Haricot n'ont pas fixé l'amylase d'orge à 0,1%. Il faut remarquer cependant que dans les deux cas positifs, c'est-à-dire où le culot accusait une réduction, on a employé l'empois de riz au lieu d'empois de Solanum. Or, nous avons vu dans les expériences précédentes, que l'empois de riz est de tous ceux que nous avons employés, celui qui fournit le plus rapidement des sucres réducteurs.

Quoiqu'il en soit, le tableau montre que la fixation n'a pas lieu dans ces conditions ou n'a lieu que très mal dans les cas positifs.

12. Fixation de l'amylase de Haricot (ferment précipité par l'alcool) par les amidons crus de Blé, Riz, Pomme de terre, Arrowroot, Orge, Haricot.

Nous avons vu dans le paragraphe de la mesure des forces des ferments employés, qu'un ferment de haricot dispersé à raison de gr. 0,3% a la même puissance amylolytique que le ferment d'orge à 0,1%. Dans cette fixation, nous avons aussi employé un ferment à 0,6% pour voir si la concentration du ferment intervenait dans le phénomène de la fixation. M. Ambard dit en effet que la fixation sera d'autant meilleure que la concentration du ferment (salive) sera plus faible.

Nous résumons dans le tableau suivant les résultats de ces expériences, dont le schéma a été, pour tous les cas, le suivant :

Gr. 0,4 d'un des 6 amidons est délayé dans 20 cm³ de solution NaCl à 2 ‰ ; à cette suspension on ajoute 1 cm³ du ferment 0,3% ou 0,6% dispersé dans l'eau ordinaire. Le mélange est agité pendant 5 minutes, puis centrifugé énergiquement ; le liquide

Ferment de Haricot		Amidons de					
		Blé	Riz	Pomme	Arrowroot	Orge	Haricot
à 3%	Liquide surnag.	* 60 cc.	41,2 cc.	* 60 cc.	40 cc.	24,4 cc.	22 cc.
		—	+	—	—	—	—
	Culot	* ∞	80 cc.	* ∞	∞	∞	∞
à 6%	Liquide surnag.	29,2 cc.	46 cc.	31,6 cc.	40 cc.	—	—
		+	+	—	+		
	Culot	60 cc.	54 cc.	∞	44 cc.	—	—

1 Les astérisques signifient que l'empois de riz a été employé pour la défixation.

surnageant est décanté et mis de côté; le culot est agité avec une nouvelle quantité d'eau salée à 2⁰/₀₀; ce nouveau mélange est centrifugé; on décante les 20 cm³ d'eau de lavage qu'on ajoute aux 20 cm³ mis de côté; on a ainsi 40 cm³ de liquide surnageant. Le culot, lavé, est une troisième fois dispersé dans 40 cm³ d'eau salée et constitue le culot; au liquide surnageant et au culot sont ajoutés 10 cm³ d'empois d'amidon de pomme de terre pour la défixation qui a lieu pendant 2 heures à la température de 37° C. L'ébullition stabilise la réaction au bout de ce temps en détruisant le ferment. On mesure alors la quantité de sucres réducteurs formés dans chaque part, liquide surnageant et culot; la mesure est fournie par le nombre de cm³ de chacun de ces liquides qu'il a fallu employer pour décolorer exactement 10 cm³ de liqueur de Fehling diluée au 1/6¹. D'autant plus grand est le chiffre (indiqué dans chaque casier du tableau), d'autant moins il y a de sucres réducteurs formés; on en infère par comparaison les quantités de ferment qui ont été entraînées par l'amidon cru et lorsqu'on trouve ∞, cela veut dire qu'il n'y a pas eu de fixation appréciable du ferment, puisque l'empois n'a été nullement saccharifié lors de la défixation.

On peut conclure des chiffres inscrits sur le tableau que, dans les conditions sus-décrites, l'amidon de Blé ne fixe pas l'amylase de haricot à 0,3%; il en est de même pour les amidons de Pomme de terre, d'Arrowroot, d'Orge et de Haricot; seul l'amidon de riz montre une fixation, faible il est vrai. Si par contre, on double la concentration du ferment (0,6%), on remarque alors que le Blé, le Riz et l'Arrowroot fixent l'amylase d'haricot, tandis que l'amidon de Pomme de terre, même à cette concentration du ferment, ne paraît pas l'absorber.

L'expérience montre donc qu'en élevant la concentration du ferment, la fixation qui échouait avec une amylase à 0,3%, réussit avec une amylase à 0,6% en présence des amidons de Blé, Riz et Arrowroot. Ce résultat est contraire à la proposition de M. Ambard, à savoir que la fixation est d'autant meilleure que la quantité de ferment est plus faible. Mais les conditions réalisées par le ferment, précipité puis redispersé, sont si différentes dans l'ordre colloïdal de celles réalisées par un ferment non dénaturé, tel que la salive diluée, qu'il est difficile de comparer les deux résultats.

¹ La liqueur de Fehling est préparée suivant les indications de Bertrand.

Dans les paragraphes 11 et 12, nous constatons que nous n'avons pas réussi à fixer sur les amidons crus d'orge et de haricot, les amylases d'orge et de haricot.

La question se pose alors de savoir si l'insuccès provient de ce que nous n'avons pas réussi à *décoller* par l'empois de pomme de terre le ferment d'orge, par exemple, fixé éventuellement sur l'amidon cru d'Orge. Il s'agit, en somme, de supposer une affinité plus grande entre le ferment et l'empois et d'offrir de l'empois d'Orge au lieu d'empois de pomme de terre.

La fixation fut la suivante : gr. 0,4 d'amidon cru d'orge sont employés pour fixer 1 cm³ d'amylase d'orge à 0,1% ; la défixation est effectuée par 10 cm³ d'empois d'amidon d'orge à 3%. Un flacon témoin est constitué par le système suivant : 1 cm³ de ferment d'Orge est mis directement en contact avec l'empois d'Orge ; ce témoin indique si une partie de la puissance amylolytique s'est perdue au cours du procès de la fixation.

Les résultats sont :

Amylase d'orge fixée par Amidon d'orge Défixation par Empois d'orge.		Amylase d'orge sur empois d'orge.
Liquide surnageant 40 cc.	Culot ∞ Il y a en fait une trace de sucre formé.	38,4 cm. ³

Cette expérience critique nous montre, en résumé, que :

1. La série homogène ferment Orge, amidon cru Orge, empois Orge (surtout ce dernier en vue d'une meilleure défixation), ne change pas les résultats précédents : la fixation est négative.

2. Que dans une expérience bien menée, il ne doit pas se perdre du ferment ; les chiffres 40 cm.³ et 38,4 cm.³, pouvant être considérés comme très proches.

13. Défixation par l'amidon soluble de Riz.

Nous avons essayé de défixer au moyen d'amidon soluble de riz ; nous avons préparé l'amidon suivant la technique décrite au chapitre 6 ; en dispersant cet amidon dans l'eau froide, on obtient un sol. Nous avons fixé, en milieu d'eau ordinaire, sur de l'amidon cru de blé et de pomme de terre, de l'amylase d'orge à 0,1%. Nous n'avons conservé pour cette expérience que les culots d'amidon chargés de ferment. A ces culots, non délayés dans un liquide de dispersion, on ajoute cet amidon soluble de Riz au lieu d'empois pour défixer. L'essai de défixation a lieu comme d'habitude et l'on mesure au bout de ce temps, la quantité de sucre formé.

Les résultats sont les suivants :

Ferment d'orge 0,1%		
1 cm ³ + Amidon Blé (cru) ↓ Culot + Amidon soluble	1 cm ³ + Amidon pomme de terre (cru) ↓ Culot + Amidon soluble	1 cm ³ + ↓ Amidon soluble
Sucre formé.		
5,2 cm ³	9,2 cm ³	3,6 cm ³

En résumé, les chiffres du tableau nous indiquent que l'amidon soluble de Riz se prête à la défixation de l'amylase d'Orge. L'amylase *non traitée* étant plus active que celle qui a passé par la fixation, cela montre qu'une partie du ferment est restée dans le liquide surnageant qu'on avait négligé de conserver.

14. Vérification des mesures de M. L. Ambard.

Ces résultats nous engagèrent à répéter les expériences de M. Ambard, avec de l'amylase de salive diluée au 1/50 et différents amidons.

La salive fut diluée immédiatement dans une solution de phosphates tampons accusant un $\text{pH} = 6.6$. On remarque, au moment où la salive tombe dans la solution saline, une légère floculation qui disparaît ensuite presque complètement, après agitation du mélange (5 cm^3 de salive pour 50 cm^3 de solution de phosphates ; cette solution est diluée au $1/5$ et l'on en prend 1 cm^3 pour la fixation).

Le mode opératoire est le même que celui décrit plus haut, la seule différence étant la nature du ferment. Le tableau suivant fournit les résultats de ces fixations :

Ferment Salive		Amidons :					
		Blé	Riz	Pomme d. t.	Arrowroot	Orge	Haricot
$1/50$	Liquide surnag.	12 cc.	20 cc.	10 cc.	36,4 cc.	14 cc.	13,2 cc.
	Culot	6 cc.	4,8	10 cc.	10 cc.	4 cc.	3,2 cc.

La défixation s'est faite partout avec de l'empois de pomme de terre.

La première observation qu'on peut faire est relative à la force amyolytique de la salive en milieu $\text{pH} = 6,6$. La fixation du ferment s'est bien effectuée, mais dans aucun cas, le ferment n'a été complètement absorbé par l'amidon cru. En effet :

le Blé	fixe les $2/3$ de l'amylase présente
le Riz	» $3/4$ » »
la Pomme	» $1/2$ » »
l'Arrowroot	+ des $2/3$ » »
l'Orge	+ des $2/3$ » »
le Haricot	fixe les $3/4$ » »

Par ordre de meilleure fixation, on peut ranger les amidons ainsi :

L'amidon de haricot fixe le mieux la salive, puis viennent : le Riz et l'Orge ; puis le Blé ; puis les amidons de tubercules, la Pomme de terre et l'Arrowroot.

15. Fixation d'une amylase d'Orge naturelle, c'est-à-dire non précipitée par l'alcool, du liquide d'extraction.

L'expérience, citée au paragraphe précédent, nous a montré qu'une amylase de salive se laisse beaucoup mieux adsorber, dans des conditions, il est vrai, différentes (pH optimum) qu'une amylase d'orge obtenue par précipitation alcoolique. Nous nous sommes demandé alors si la coagulation par l'alcool fort, du ferment extrait des tissus de l'Orge, n'altérerait pas les propriétés colloïdales du ferment, le rendant ainsi moins apte à l'adsorption par l'amidon cru. Pour nous en rendre compte, nous avons essayé de dépouiller de son ferment, par l'amidon cru d'Orge, le liquide de macération du malt. En d'autres termes, nous avons fixé la diastase, telle qu'on l'obtient par l'extraction et qui n'a, semble-t-il, subi aucune modification colloïdale ; nous l'appellerons amylase naturelle, par opposition à l'amylase précipitée, c'est-à-dire dénaturée par l'alcool.

Le ferment que nous avons employé dans cette expérience a été préparé comme suit :

Du malt est mis à macérer pendant 24 h., dans une solution tampon, mélange de phosphates primaire potassique et secondaire sodique, réalisant un pH = 6,6 ; après décantation et filtration, on prend cm³ 0,5 de ce liquide diastasique pour procéder à la fixation de cette amylase par de l'amidon d'orge, suivant la technique que nous avons déjà décrite. Nous avons délayé gr. 0,4 d'amidon cru d'Orge dans 20 cm³ d'une solution tampon (mélange de phosphates I et II), réalisant un pH = 5 ; puis la même quantité d'amidon est mise dans des solutions salines analogues, mais de pH respectivement 6,6 et 7,6. Le tableau suivant fournit les résultats de l'expérience :

		<i>Amidon d'orge en milieu :</i>		
		pH = 5	pH = 6.6	pH = 7.6
Ferment d'Orge non précipité	Liquide surnag.	2,4 cc.	2 cc.	5,2 cc.
	Culot	4,8 cc.	5,2 cc.	15,2 cc.

L'empois de pomme de terre à 3% à été utilisé pour la défixation. Conclusions : L'amidon a fixé l'amylase naturelle ; la fixation n'a pas été intégrale, c'est-à-dire qu'il est resté dans le liquide sur-nageant plus de ferment que dans le culot. On voit, d'autre part, l'action exercée par l'acidité du milieu sur la fixation proprement dite ; elle se fait mieux au $\text{pH} = 5$ qu'au $\text{pH} = 6.6$ et surtout qu'au $\text{pH} = 7,6$ pour laquelle réaction on note une véritable diminution de fixation ; il faut bien remarquer que ces pH concernent le moment de la fixation et non celui de l'amylolyse de l'empois de Solanum.

SÉRIE B :

16. Fixation des amylases d'orge (0,1 %) et de haricot (0,3 %), en milieu phosphate (pH=6.6) par les amidons crus d'Orge, de Haricot, de Blé, de Riz, de Pomme de terre et d'Arrowroot.

Nous avons répété les opérations décrites aux paragraphes 11 et 12, en prenant soin, cette fois-ci, que l'amylase soit dispersée dans une solution saline de pH optimum et que le milieu dans lequel se passe la fixation ait la même réaction exprimée par le pH = 6,6. Nous avons employé, dans ces expériences, des ferments en poudre, tels qu'on les obtient après précipitation par l'alcool. On disperse dans un mortier, aux concentrations respectives de 0,1 % et 0,3 %, les ferments d'Orge et de Haricot avec une solution de mélange tampon-phosphates de pH = 6,6 : les amidons destinés à fixer la diastase sont délayés dans le même liquide qui servira, également, aux lavages ultérieurs. La défixation s'opère au moyen de l'empois de pomme de terre à 0,3 %, comme d'habitude.

Ferment		<i>Amidons crus de :</i>						pH = 6.6
		Blé	Riz	Pomme	Arrowroot	Orge	Haricot	
d'Orge 0,1 %	Liquide surnag.	40 cc.	44,4 cc.	32,8 cc.	46 cc.	4 cc.	46,4	}
		+	+	+	+	+	—	
	Culot	20 cc.	26,8 cc.	18,8 cc.	10 cc.	5,2 cc.	∞	
Haricot 0,3 %	Liquide surnag.	20 cc.	44 cc.	22 cc.	30 cc.	12 cc.	21,6 cc.	
		+	+	+	+	+	+	
	Culot	20 cc.	21 cc.	32,8 cc.	25,2 cc.	15,2	24,8 cc.	

Les résultats sont les suivants :

1. Il y a eu fixation des deux amylases par tous les amidons crus, à l'exception de l'amidon de haricot qui n'a pas fixé l'amylase d'orge.

2. Comparativement aux expériences de fixation opérées dans le milieu d'eau ordinaire ($\text{pH} = 7,6$), les dernières effectuées en milieu phosphates ($\text{pH} = 6,6$) ont beaucoup mieux réussi.

3. Dans aucun cas cependant, nous n'avons pu observer de fixation intégrale, c'est-à-dire qu'il est toujours resté dans le liquide surnageant une quantité de ferment égale ou un peu inférieure à celle fixée sur l'amidon cru.

4. D'une manière générale, l'amylase d'Orge a été mieux fixée par les amidons crus que l'amylase de Haricot.

Par ordre de meilleure fixation de l'amylase d'Orge, il faut ranger en premier lieu : l'amidon cru d'Orge, puis d'Arrowroot, puis de Pomme de terre, puis de Blé, puis de Riz et enfin de Haricot qui ne fixe pas. Pour l'amylase de Haricot, l'ordre est le suivant : Orge, Blé, Riz, Haricot, Arrowroot et Pomme de terre.

Il y a lieu de remarquer que l'ordre n'est pas le même pour les deux ferments. Toutes ces fixations ayant été rigoureusement effectuées d'une manière identique, les comparaisons peuvent se faire ; il en est de même pour celles qui ont été faites en milieu d'eau ordinaire ; seule la réaction du milieu a varié.

Fixation à basse température.

Monsieur Ambard, ayant attiré notre attention sur la nécessité qu'il y a de travailler à basse température pour éviter, pendant la fixation, une hydrolyse de l'amidon cru, nous avons opéré à la température de 0° C. les fixations suivantes :

Le ferment d'Orge à 0,1% préparé dans un milieu phosphates de $\text{pH} = 6,6$, est mis au froid dans de la glace chargée de sel marin ; on refroidit de même l'amidon délayé dans la solution phosphates. Bref, toute l'opération est faite à 0° C., sauf la défixation par l'empois de Solanum, qui a lieu à 37° C. Les résultats sont consignés dans la table suivante :

Ferment		Amidons :		
		d'Arrowroot	de Riz	
d'Orge 0,1 %	Liquide surnageant	13,6 cc.	20 cc.	pH = 6.6 température : 0° C
	Culot	40 cc.	20 cc.	

Le froid n'a pas modifié les résultats antérieurs ; la fixation est loin d'être intégrale.

17 Fixation en fonction de la réaction du milieu.

Nous avons vu que l'amylase naturelle d'Orge, c'est-à-dire non précipitée, était mieux fixée en milieu acide qu'en milieu alcalin. Nous avons fait la même étude à propos des amylases précipitées d'Orge et de Haricot et dispersées dans des solutions tampons de mélanges de phosphates réalisant différentes concentrations en ions H.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

			pH = 5	pH = 6,6	pH = 7.6
			Ferment d'Orge 0,1 % fixé par Amidon Orge.	Liquide surnageant	
Culot		4,4 cc.			12 cc.
	Ferment de Haricot 0,3 % fixé par l'Amidon d'Haricot	Liquide surnageant		21,6	21,6
Culot				22,4	24,8

On voit par ces chiffres que la fixation est d'autant meilleure que le milieu est plus acide et cela pour les deux ferments.

L'alcalinité correspondant au pH = 7,6 cause déjà un affaiblissement de la fixation des diastases.

18. Fixation par les amidons solubles des amy- lases de Haricot et d'Orge.

Nous avons examiné les amidons solubles pour voir si la première dégradation du grain d'amidon entraînerait une diminution des propriétés colloïdales dont dépend la fixation du ferment.

Les amidons solubles ont été préparés suivant la technique déjà décrite page 7.

Sous cette forme, l'amidon peut être facilement dispersé dans l'eau froide ou dans une solution saline de pH déterminé. Si on n'a pas chauffé un peu, cet amidon délayé se sédimente rapidement.

La fixation a été faite comme d'habitude en milieu de solution de phosphates, réalisant une concentration en ions H exprimée par $\text{pH} = 6,6$. La défixation est faite par l'empois de Solanum.

Ferments :		Amidon soluble de :			
		Blé	Riz	Pomme d. t.	Arrowroot
Haricot 0,3 %	Liquide surnag.	27,2 cc.	30 cc.	48, 8 cc.	44 cc.
	Culot	16 cc.	28 cc.	30 cc.	46 cc.
Orge 0,1 %	Liquide surnag.	> 50 cc.	> 48 cc.	> 50 cc.	> 49 cc.
	culot	29,6 cc.	18 cc.	47,2 cc.	40 cc.

Le tableau montre que les différents amidons solubles (Blé, Pomme de terre, Riz, Arrowroot), dispersés à froid se prêtent bien, en milieu phosphates ($\text{pH} = 6,6$), à la fixation, soit de l'amylase d'orge, soit de l'amylase de haricot. On voit par cette expérience que la dislocation du grain d'amidon et la disparition d'une partie des matières salines fixées au grain, ne lui font pas perdre ses propriétés d'adhésion pour l'amylase.

Si on compare l'ordre suivant lequel les différents amidons solubles collent le mieux la diastase, on remarque que cet ordre

est l'inverse de celui observé pour les amidons crus. En effet, pour l' :

Amylase d'orge :

	<i>Amidon cru</i>		<i>Amidon soluble</i>
meilleure	↓	Arrowroot	Blé
Fixation		Pomme d. terre	Riz
		Blé	Pomme de terre
moindre		Riz	Arrowroot

Tandis que pour l' : *Amylase d'Haricot*

meilleure	↓	Blé	Riz
Fixation		Riz	Blé
		Arrowroot	Arrowroot
moindre		Pomme d. terre	Pomme de terre

l'ordre demeure à peu près le même

19. Etude comparée de l'action des sels et de la réaction du milieu sur la fixation.

En comparant les fixations faites dans le milieu eau (pH = 7,6) avec celles effectuées dans une solution saline de pH déterminé, on trouve que ces dernières sont meilleures. Il y a lieu de se demander alors quelle est la part de l'anion (sel phosphorique, par exemple) et quelle est celle de l'acidité (cathion H) dans cette catalyse de la fixation.

Pour élucider cette question, nous avons opéré trois fixations parallèles d'amylase d'Orge 0,1% par l'amidon d'Arrowroot.

1. Une fixation faite dans un milieu accusant un pH = 6,6, réalisé par un mélange tampon de solutions de glycocolle N/10 et de soude caustique N/10. Le ferment est dispersé dans ce liquide ; l'amidon de fixation y est également délayé.

2. Une fixation faite dans le mélange précédemment cité de phosphates, accusant aussi une réaction, correspondant au pH = 6,6.

3. Une fixation faite dans un milieu accusant un pH = 6,6, réalisé par le mélange d'une solution de citrate sodique N/10 et de soude caustique N/10.

Une fixation témoin est opérée dans le milieu d'eau ordinaire de pH = 7,6.

En résumé, des milieux de même concentration en ions H et de compositions salines différentes.

L'opération peut se résumer dans le tableau suivant :¹⁾

	<i>Milieu</i>			
	<i>Glycocolle</i>	<i>Phosphate</i>	<i>Citrate</i>	<i>Eau</i>
Liq. surnag.	5,2 cc.	5,6 cc.	6,2cc.	31,2 cc.
Culot	12,0 cc.	10,8 cc.	∞ cc.	∞ cc.
	pH = 6,6			pH = 7,6

Ces résultats sont fournis par la défixation au moyen d'empois d'amidon de Pomme de terre. Si on compare les chiffres obtenus pour les liquides surnageants, on voit clairement par cette expérience l'influence capitale exercée par la réaction du milieu. Quelque soit le système tampon employé, on trouve des chiffres qui varient peu 5,2, 5,6, 6,2 pour le pH = 6,6, comparativement au chiffre 31,2 pour le pH = 7,6.

Si l'on compare au contraire les fixations proprement dites (culots), on remarque qu'il y a eu fixation, un peu meilleure en milieu phosphate qu'en milieu glycocolle et que, d'autre part, comme nous l'avons déjà signalé, en milieu d'eau il n'y a pas eu fixation.

Cette expérience nous révèle encore la propriété très curieuse qu'ont les citrates de s'opposer *totalemment* à la fixation du ferment sur le grain d'amidon.

Cette inhibition de l'absorption évoque le rôle protecteur des citrates et des oxalates dans les procès de coagulations par les enzymes.

¹⁾ Confer. aussi : Fernand Chodat et Meliton Philia. *Compte-Rendu des séances de la Soc. de Phys. et d'Hist. Nat. de Genève* (1924) Avril-Juillet.