

im allgemeinen gleich. Es findet sich eine Erhöhung bei Eiweiss-Fütterung und im Hungerzustand im Vergleich zu Kohlehydrat-Kost. Etwas weniger deutlich ist der Anstieg gegenüber den mit Fett gefütterten Tieren.

Im Gegensatz dazu verhalten sich Histidin und Arginin anders. Der Histidinegehalt ist bei allen Ernährungsformen und im Hungerzustand gleich. Das Arginin ist nur wenig beeinflussbar; bei Kohlehydrat-Fütterung ist der Gehalt etwas geringer als bei Hunger, Eiweiss- oder Fett-Fütterung.

Es kommt somit auch in dieser Versuchsanordnung zum Ausdruck, dass Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Lysin, Tryptophan und Threonin für den Organismus unentbehrlich sind. Ihr Gehalt sinkt ab, wenn sie nicht mit der Nahrung zugeführt oder durch Abbau des Körpereiweisses im Blute angereichert werden. Dass Histidin und Arginin sich anders verhalten, steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass sie unter den essentiellen Aminosäuren eine Sonderstellung einnehmen. Das Histidin ist nach Untersuchungen von *Rose* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> für den erwachsenen Organismus entbehrlich. Das Arginin kann von jungen Ratten vollständig, vom ausgewachsenen Tier teilweise synthetisiert werden<sup>2)</sup> und hat zudem als Stoffwechselzwischenprodukt der Harnstoffbildung besondere Aufgaben.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

#### 284. Sur les enzymes amylolytiques X<sup>3)</sup>.

Isolement et cristallisation de l' $\alpha$ -amylase de salive humaine

par Kurt H. Meyer, Ed. H. Fischer<sup>4)</sup>, A. Staub, et P. Bernfeld.

(20 X 48)

Après avoir purifié<sup>5)</sup> et cristallisé<sup>6)</sup> l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc, il nous a semblé intéressant d'étendre nos recherches à des amylases d'autres provenances. C'est ainsi que l' $\alpha$ -amylase de bactérie

<sup>1)</sup> *W. C. Rose, W. J. Haines, J. E. Johnson und D. T. Warner, J. Biol. Chem.* **148**, 457 (1943).

<sup>2)</sup> *E. W. Burroughs, H. S. Burroughs und H. H. Mitchell, J. Nutr.* **19**, 363 (1940); *M. Womack und W. C. Rose, J. Biol. Chem.* **141**, 375 (1941); *W. C. Rose und T. R. Wood, J. Biol. Chem.* **141**, 381 (1941).

<sup>3)</sup> IXme communication, *Helv.* **31**, 1839 (1948).

<sup>4)</sup> Boursier de la «Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie».

<sup>5)</sup> *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper.* **2**, 362 (1946); *Helv.* **30**, 64 (1947).

<sup>6)</sup> *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper.* **3**, 106 (1947); *Arch. Biochem.* **14**, 149 (1947); *Helv.* **31**, 1831 (1948).

(*B. subtilis*) a pu être obtenue à l'état cristallisé<sup>1)</sup>. Dans le présent travail, nous rapportons l'isolement et la cristallisation de l' $\alpha$ -amylase de salive humaine<sup>2)</sup>.

L'action digestive de la salive humaine sur l'amidon fut observée pour la première fois par *Leuchs* en 1831<sup>3)</sup>. *Berzelius* appela «ptyaline» le principe actif de la salive. On ne reconnut que plus tard la nature enzymatique de cette substance.

Nombreux sont les travaux qui traitent des propriétés de cet enzyme et de son action sur l'amidon, mais tous ont été effectués avec des préparations d'amylase impure. La purification de l'enzyme a fait l'objet d'un petit nombre de travaux rudimentaires seulement. Le plus souvent les auteurs ont fait appel à des méthodes d'adsorption en employant le  $(PO_4)_2Ca_3$ <sup>4)</sup> ou l'oxyde d'aluminium hydraté<sup>5)</sup> comme adsorbant. Un certain enrichissement par précipitation au moyen de sulfate d'ammonium a été obtenu par *Ninomiya*<sup>6)</sup>.

#### *La salive.*

L'amylase ne se trouve que dans la salive de quelques espèces animales, soit chez l'homme, le singe, le porc, le rat, la souris, le cobaye et l'écureuil, alors que la salive du cheval, du chien, du chat entre autres en est dépourvue<sup>7)</sup>. La salive est produite par les glandes parotides, sous-maxillaires et sublinguales. Chez l'homme, ces trois glandes sécrètent de l'amylase, à côté d'autres protéines et de sels. Les sous-maxillaires et surtout les sublinguales sécrètent encore de la mucine. L'homme produit normalement environ 1 litre de salive par jour. Celle-ci contient en moyenne 0,33% de substances organiques constituées en majeure partie par des matières protéiques. À part l' $\alpha$ -amylase, plusieurs autres enzymes ont été signalés dans la salive humaine. Ce sont surtout une oxydase<sup>7)</sup>, certaines protéases<sup>7)</sup> et le lysozyme<sup>8)</sup>. La salive humaine contient en outre environ 0,2% de chlorure de sodium et de petites quantités d'autres sels, notamment des phosphates, des sulfates, des hydrogénocarbonates et des sulfo-cyanures de potassium, de calcium et de magnésium. Le pH de la salive humaine varie entre 6,9 et 7,5.

#### *Produit de départ.*

Nous avons recueilli la salive provenant d'une vingtaine de personnes. Lorsqu'on mâche de la paraffine, la sécrétion salivaire est

<sup>1)</sup> *K. H. Meyer, M. Fuld et P. Bernfeld, Exper.* **3**, 411 (1947).

<sup>2)</sup> Communication préliminaire, *Exper.* **3**, 455 (1947).

<sup>3)</sup> *E. F. Leuchs, Poggendorff's Ann. d. Phys. Chem.* **22**, 623 (1831).

<sup>4)</sup> *J. Cohnheim, Virch. Arch.* **28**, 241 (1863).

<sup>5)</sup> *E. Ernström, Z. physiol. Ch.* **119**, 190 (1922); *K. Myrbäck, Z. physiol. Ch.* **159**, 1 (1926).

<sup>6)</sup> *H. Ninomiya, J. Biochem. Tokyo,* **31**, 69 (1940); *C. 1940*, II, 1882.

<sup>7)</sup> *C. Oppenheimer, Handbuch d. Biochemie, Iéna*, 2e éd., **4**, 487 (1925).

<sup>8)</sup> *A. Fleming, Proc. Roy. Soc. London, [B]* **93**, 306 (1922).

augmentée, surtout celle des glandes parotides. Un homme peut ainsi produire en une heure de 50 à 100 cm<sup>3</sup> de salive ne contenant que peu de mucine et possédant une activité amylatique à peine inférieure à celle d'une salive dont on n'a pas stimulé la sécrétion par la paraffine. Après centrifugation, elle se présente comme une liqueur fluide et légèrement trouble. En présence de thymol ou de toluène, elle peut être conservée à basse température (0 à + 4°) pendant plusieurs mois, sans perdre de son activité amylatique.

Les *dosages d'activité* sont effectués comme décrit précédemment<sup>1)</sup>. On dose colorimétriquement les sucres réducteurs formés en 3 min. à 20° par l'action de l'enzyme sur l'amidon soluble *Zulkowski*. Lors de la réaction, la solution contient 0,5% de substratum, des phosphates 0,01-m. qui tamponnent à pH 6,9 et du chlorure de sodium 0,0035-m. La valeur de réduction est exprimée en mgr. de maltose hydraté, et le degré de pureté par le quotient: mgr. de maltose par mgr. d'azote de l'enzyme.

#### *Purification et cristallisation.*

Nous avons mis au point deux méthodes de purification de l'α-amylase de salive humaine. La première permet d'obtenir l'enzyme à l'état cristallin, sans avoir recours à des cristaux d'amorçage. La deuxième méthode, très raccourcie et simplifiée, est d'un rendement très supérieur, mais exige l'emploi de cristaux d'amorçage.

La première méthode (sans cristaux d'amorçage) se rapproche de celle utilisée pour la purification de l'α-amylase de pancréas de porc. Les principales opérations et données de cette méthode sont indiquées dans le tableau 1:

Tableau 1.

| Opération  | Limites de fractionnement | Rendement par rapport à la salive brute % | Degré de pureté*) |
|--|---------------------------|---|-------------------|
| Salive brute . . . . .                                       | —                         | —   | 790               |
| Acétone I . . . . .  | 48—70%                    | 90  | 2440              |
| Acétone II . . . . .   | 50—70%                    | 77  | 4200              |
| SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> I . . . . .  | 0,46 sat.                 | 45  | 5450              |
| SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> II . . . . . | 0,40 sat.                 | 36  | 5930              |
| Acétone III . . . . .  | 52—70%                    | 30  | 6050              |
| Amberlite basique . . . . .                                  | —                         | 30  | 6050              |
| Acétone IV . . . . .   | 0—70%                     | 30  | 6050              |
| Cristallisation sans amorçage . . . . .                      | —                         | 24  | 6200              |

\*) Exprimé en mgr. maltose par mgr. azote *Kjeldahl*.

<sup>1)</sup> *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Helv. 30, 64 (1947); G. Noelting et P. Bernfeld, Helv. 31, 286 (1948).*

La deuxième méthode de purification (avec cristaux d'amorçage seulement) ne comporte que les deux premiers stades de la précédente, très légèrement modifiés (voir tableau 2).

Tableau 2.

| Opération                      | Limites de fractionnement | Rendement par rapport à la salive brute | Degré de pureté*) |
|--------------------------------|---------------------------|---|-------------------|
| Salive brute . . . . .         | —                         | —                                       | 790               |
| Acétone I . . . . .            | 50—68%                    | 81                                      | 3530              |
| Acétone II . . . . .           | 50—70%                    | 63                                      | 5050              |
| Cristallisation par amorçage . | —                         | 50                                      | 5700              |

\*) Exprimé en mgr. maltose par mgr. azote *Kjeldahl*.

En disposant une fois de cristaux d'amorçage, on peut préparer très facilement de grandes quantités d'enzyme cristallisé. Le degré de pureté des cristaux peut être élevé par plusieurs recristallisations sans grande perte de substance.

#### *Recristallisation.*

Les cristaux d' $\alpha$ -amylase de salive humaine sont extrêmement peu solubles dans l'eau aux environs de la neutralité, mais ils se dissolvent facilement et sans perte d'activité à  $p_H$  11. En neutralisant cette solution, la recristallisation se fait rapidement et avec un bon rendement, éventuellement après amorçage (voir fig. 1). Après 3 recristallisations successives, le quotient activité par azote des cristaux n'augmente plus et le degré de pureté des eaux-mères atteint celui des cristaux (voir tableau 3).

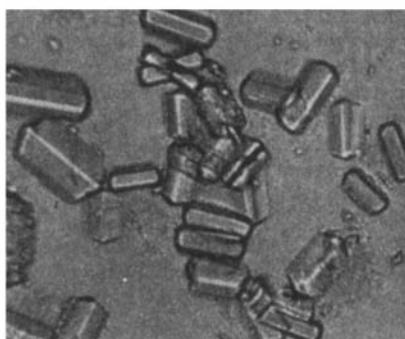
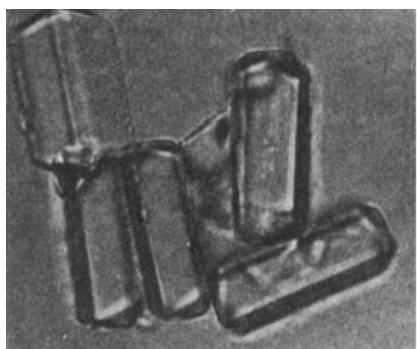


Fig. 1.  
Cristaux d' $\alpha$ -amylase de salive humaine.

Tableau 3.

| Opération               | Pourcentage de l'enzyme<br>se trouvant dans la phase<br>solide | Degré de pureté*) |            |
|-------------------------|--|-------------------|------------|
|                         |  | Cristaux          | Eaux-mères |
| 1re cristallisation . . | 80   | 5700              | 2000       |
| 1re recristallisation . | 80   | 6200              | 4200       |
| 2me recristallisation . | 80   | 6400              | 6000       |
| 3me recristallisation . | 80   | 6400              | 6200       |

\*) Exprimé en mgr. maltose par mgr. azote *Kjeldahl*.

#### *Pureté de l' $\alpha$ -amylase de salive humaine cristallisée.*

Le fait que le degré de pureté des eaux-mères atteint, par recristallisations, celui des cristaux, prouve que le produit cristallisé est bien l' $\alpha$ -amylase pure. Ce résultat est confirmé par l'électrophorèse qui donne, à différents  $p_H$ , les diagrammes d'une substance homogène.

#### *Teneur de la salive en amylase.*

Un litre de salive contient donc 0,4 gr. d'amylase pure, constituant environ 12% de sa teneur en substances organiques. Par un enrichissement de 7,5 à 8 fois, on obtient environ 100 mgr. d'enzyme cristallisé à partir d'un litre de salive, selon la première méthode, et 200 mgr., ou 130 mgr. après 2 recristallisations, selon la méthode raccourcie.

Les propriétés de l' $\alpha$ -amylase de salive humaine cristallisée sont traitées dans la communication suivante.

### **Partie expérimentale.**

#### *Purification.*

Le dosage d'activité, la méthode de travail ainsi que les produits utilisés pour la purification ont été décrits précédemment<sup>1)</sup>. Toutes les opérations de purification se font entre 0 et + 4°, toutes les centrifugations s'opèrent à 3000 tours/min. et dans des tubes couverts. Lors des précipitations à l'acétone, on continue l'agitation pendant 15 min. après chaque adjonction d'acétone pour que l'équilibre soit atteint avant les centrifugations.

*Produit de départ:* Une vingtaine de personnes produisent environ 1,5 litres de salive au cours d'une heure lorsqu'elles mâchent de la paraffine. La salive est recueillie en présence de quelques gouttes d'alcool décylique pour supprimer la mousse. La salive brute est centrifugée pendant une heure et peut être conservée à froid en présence de thymol ou de toluène pendant plusieurs mois.

#### *Méthode sans cristaux d'amorçage.*

*Stade I:* 1500 cm<sup>3</sup> de salive centrifugée sont additionnés en 40 min. de 1380 cm<sup>3</sup> d'acétone (48%)<sup>2)</sup>. On centrifuge et rejette le culot contenant en plus de protéines inactives la grande majorité des mucoïdes. A la solution décantée ( $p_H$  6,3), on ajoute 2120 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Helv. **30**, 64 (1947).

<sup>2)</sup> Les chiffres entre parenthèses indiquent la concentration finale des solutions en acétone.

d'acétone (70%) en 40 min. Après centrifugation, on rejette la solution surnageante et dissout le culot jaunâtre dans 350 cm<sup>3</sup> d'eau. Cette solution contient 0,42% de protéines et a un pH de 6,8. Rendement 90%, enrichissement 3,1 fois par rapport à l'azote *Kjeldahl*.

*Stade II:* 350 cm<sup>3</sup> de la solution du stade I sont additionnés de 2 gr. de CH<sub>3</sub>COONa, puis de 350 cm<sup>3</sup> d'acétone (50%) en 20 min. On centrifuge et rejette le culot qui contient le reste des mucoïdes. La solution décantée est additionnée de 470 cm<sup>3</sup> d'acétone (70%) en 20 min. On centrifuge, rejette la solution et dissout le culot dans 250 cm<sup>3</sup> d'eau. Le pH de cette solution est 6,5 et sa teneur en protéines 0,29%. Rendement en activité: 85%; enrichissement: 1,7 fois par rapport au stade précédent.

*Stade III:* Ce stade ainsi que le suivant doivent être effectués aussi rapidement que possible, en respectant les temps indiqués. 250 cm<sup>3</sup> de la solution du stade II sont portés à pH 8,0 par quelques gouttes NH<sub>4</sub>OH 0,1-n. et additionnés d'un seul coup et sous agitation modérée de 209 cm<sup>3</sup> d'une solution de sulfate d'ammonium, saturée à 0° et ajustée préalablement au pH 8,0 par NH<sub>4</sub>OH (0,455 saturation). On continue l'agitation pendant 30 min., puis on centrifuge pendant 30 min., rejette la solution surnageante et dissout le culot dans 80 cm<sup>3</sup> d'eau. Le pH de cette solution est 6,8; sa teneur en protéines 0,41%. Rendement en activité: 60%; enrichissement: 1,3 fois par rapport au stade précédent.

*Stade IV:* 80 cm<sup>3</sup> de la solution du stade III sont portés au pH 8,0 par quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH 0,1-n. et additionnés d'un seul coup d'une quantité de la solution saturée de sulfate d'ammonium, portant la concentration de ce sel à 0,40 saturation, compte tenu du sulfate d'ammonium provenant de l'opération précédente. On continue l'agitation pendant 30 min., puis on centrifuge pendant 30 min., rejette la solution surnageante et dissout le culot dans 40 cm<sup>3</sup> d'eau. Le pH de cette solution est 6,0 et sa teneur en protéines 0,61%. Rendement en activité: 80%; enrichissement: 1,1 fois par rapport au stade précédent.

*Stade V:* 40 cm<sup>3</sup> de la solution du stade IV sont ajustés à pH 7,0 par NaOH 0,1-n., puis additionnés de 43 cm<sup>3</sup> d'acétone (52%) en 15 min. On centrifuge, rejette le faible culot et ajoute à la solution surnageante 1 gr. de CH<sub>3</sub>COONa, puis 50 cm<sup>3</sup> d'acétone (70%) en 15 min. On centrifuge, rejette la solution surnageante et dissout le culot dans 15 cm<sup>3</sup> d'eau. Le pH de cette solution est 5,9 et sa teneur en protéines 1,34%. Rendement en activité: 85%; enrichissement par rapport au stade précédent: 1,02 fois. Le but de cette opération est d'éliminer une grande partie du sulfate d'ammonium.

*Stade VI:* 15 cm<sup>3</sup> de la solution du stade V sont traités pendant deux heures par 3 gr. d'Amberlite IR-4B, chargé préalablement à l'acétate de sodium et lavé, en agitant modérément la suspension. Puis on décante la solution, rince deux fois soigneusement l'Amberlite avec un peu d'eau et réunit les eaux de lavage avec la solution décantée. On répète encore deux fois cette opération avec de nouvelles portions d'Amberlite. A la fin, on récupère 28 cm<sup>3</sup> de solution contenant 0,73% de protéines. Le pH a passé au cours de ce traitement de 5,9 à 7,5. Rendement en activité: 100%; enrichissement nul. Le but de cette opération est de transformer le sulfate d'ammonium en acétate d'ammonium ne précipitant pas avec l'acétone.

*Stade VII:* 28 cm<sup>3</sup> de la solution du stade VI sont centrifugés pour éliminer des particules d'Amberlite entraînées, puis additionnés de 65 cm<sup>3</sup> d'acétone (70%) en 10 min. On centrifuge, décante et rejette la solution surnageante, puis maintient le tube contenant le précipité parfaitement blanc d'amylase pure, en position renversée pendant 5 min. environ pour égoutter autant d'acétone que possible. On essuie les parois intérieures du tube avec un papier filtre et triture finalement le culot avec 2 cm<sup>3</sup> NaOH 0,1-n. L'amylase finit par se dissoudre entièrement et on obtient environ 3 cm<sup>3</sup> d'une solution sursaturée d'une teneur en protéines de 6,6% et possédant un pH de 8,2. Rendement en activité: 100%; enrichissement nul. Le but de cette opération est surtout de concentrer la solution de protéines.

*Cristallisation:* En abandonnant la solution sursaturée du stade VII à froid, l'amylase cristallise spontanément. Après 24 heures, environ 60% de l'enzyme se trouvent à l'état cristallin et après 2 jours, environ 80% ont cristallisé.

*Méthode raccourcie (avec cristaux d'amorçage seulement).*

*Stade I'*: 4300 cm<sup>3</sup> de salive centrifugée sont additionnés en 60 min. de 4300 cm<sup>3</sup> d'acétone (50%). On centrifuge, rejette le culot et ajoute à la solution décantée 4800 cm<sup>3</sup> d'acétone (68%) en 60 min. On centrifuge, rejette la solution et dissout le culot jaunâtre dans 250 cm<sup>3</sup> d'eau. Cette solution contient 1,16% de protéines et a un pH de 6,5. Rendement en activité: 81%; enrichissement: 4,5 fois.

*Stade II'*: 250 cm<sup>3</sup> de la solution du stade I' sont ajustés au pH 7,0 par quelques gouttes de NaOH 0,1-n., puis additionnés de 250 cm<sup>3</sup> d'acétone (50%) en 20 min. On centrifuge, rejette le culot et ajoute à la solution surnageante 2 gr. CH<sub>3</sub>COONa, puis 280 cm<sup>3</sup> d'acétone (68%) en 20 min. On centrifuge de nouveau, décante et rejette la solution surnageante, puis on débarrasse le culot encore légèrement jaune et contenant l'amylase, de l'acétone, en maintenant le tube renversé comme décrit sous stade VII. Le culot est finalement dissous dans 20 cm<sup>3</sup> NaOH 0,01-n. et on obtient 26,5 cm<sup>3</sup> d'une solution contenant 5,1% de protéines et possédant un pH de 6,8. Rendement en activité: 78%; enrichissement: 1,4 fois par rapport au stade précédent.

*Cristallisation*: la solution sursaturée du stade II' est ajustée à pH 7,5 par quelques gouttes de NaOH 0,02-n., amorcée avec une petite quantité de cristaux obtenus selon la méthode précédente et placée sur une secouuseuse lente à 0°. La cristallisation commence en peu de temps et après deux jours, 80 % de la substance active se trouvent sous forme cristalline.

*Recristallisation.*

La suspension des cristaux provenant de l'une ou de l'autre des méthodes décrites est centrifugée. Les cristaux d'amylase sont rapidement lavés en les trituant avec une petite quantité d'acétone à 30% préalablement refroidie et en les centrifugeant immédiatement. Cette opération est répétée encore deux fois. Puis on suspend les cristaux dans très peu d'eau et porte le pH à 11,0 par addition de NaOH 0,04-n. On place la suspension sur une secouuseuse lente à froid. Au fur et à mesure que les cristaux se dissolvent, le pH baisse. On le maintient à 11 par addition de NaOH 0,04-n. jusqu'à dissolution complète des cristaux. On neutralise alors par CH<sub>3</sub>COOH 0,1-n., centrifuge la solution pour éliminer une faible quantité de substances insolubles et laisse cristalliser comme précédemment, éventuellement après amorçage. Après chaque cristallisation, on détermine l'activité amylatique et la teneur en azote *Kjeldahl* des cristaux et de leurs eaux-mères. Les dosages d'azote se font après élimination des traces éventuelles de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> par un traitement à MgO. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3.

Ces recherches ont été encouragées par des crédits ouverts par la Confédération en vue de créer des possibilités de travail.

**RÉSUMÉ.**

L' $\alpha$ -amylase de salive humaine a été isolée et cristallisée. L'enrichissement rapporté à l'azote *Kjeldahl* est de 8,1 fois. Le rendement de la purification est de 50% en produit cristallisé, et de 32% en enzyme pur, deux fois recristallisé. Après trois recristallisations successives, les eaux-mères et les cristaux présentent le même degré de pureté. A l'électrophorèse, l'enzyme cristallisé se comporte comme une substance homogène. Il doit être considéré comme de l' $\alpha$ -amylase de salive humaine pure.

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