

285. Sur les enzymes amylolytiques XI¹⁾.Propriétés de l' α -amylase de salive humaine cristalliséepar P. Bernfeld, A. Staub et Ed. H. Fischer²⁾.

(20 X 48)

Un grand nombre de travaux ont été publiés sur les propriétés de l' α -amylase de salive humaine. Presque tous les auteurs observent qu'elle est très stable et que cette stabilité n'est que peu influencée par le p_H . *Ernström*³⁾ étudia d'une façon très approfondie l'influence du p_H et de la température sur l'activité de cet enzyme. L'importance de la présence du chlorure de sodium pour l'activité amylatique de la salive fut rapidement reconnue⁴⁾⁵⁾. D'après *Wohlgemuth*⁶⁾, déjà 0,001% de ClNa peut augmenter l'action amylatique de la salive. *Bang*⁷⁾ observa une forte diminution de l'activité amylatique de la salive lors de la dialyse et une nette réactivation par le chlorure de sodium. Il situe à 0,05% l'optimum de la concentration du ClNa. D'autres sels comme BrNa, INa, NO₃Na, NO₂Na et ClO₃Na possèdent également un certain effet activateur, quoique plus faible, sur l'amylase salivaire⁵⁾⁶⁾. Les phosphates, sulfates et acétates n'ont aucune action sur l'enzyme.

L'action de l'amylase salivaire sur l'amidon est généralement considérée comme celle d'une α -amylase. Quelques auteurs veulent encore avoir trouvé dans la salive brute une β -amylase⁸⁾ ou une maltase⁹⁾. *Haworth*⁹⁾, enfin, prête à la salive une action enzymatique qui déplacerait les points de ramification le long des chaînes α -1,4-glucosidiques, opinion qu'il a récemment révisée¹⁰⁾.

Disposant d'amylase de salive humaine pure et cristallisée, nous avons entrepris une étude des propriétés de cet enzyme et confirmé en partie les observations faites par d'autres sur des préparations d'enzyme impur. Nous avons en outre comparé ses propriétés à celles

¹⁾ Xme communication, *Helv.* **31**, 2158 (1948).

²⁾ Boursier de la «Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie».

³⁾ *E. Ernström*, *Z. physiol. Ch.* **119**, 190 (1922).

⁴⁾ *O. Nasse*, *Pflügers Arch.* **11**, 138 (1875); *R. H. Chittenden* et *J. S. Ely*, *J. Physiol.* **3**, 327 (1882).

⁵⁾ *F. Kübel*, *Pflügers Arch.* **76**, 276 (1899).

⁶⁾ *J. Wohlgemuth*, *Biochem. Z.* **9**, 10 (1908).

⁷⁾ *I. Bang*, *Biochem. Z.* **32**, 417 (1911).

⁸⁾ *L. Anker* et *H. J. Vonk*, *Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. of Sect. Sci.* **44**, 677 (1946); *C. A.* **40**, 7255 (1946).

⁹⁾ *W. N. Haworth*, *H. Kitchen* et *S. Peat*, *Soc.* **1943**, 619.

¹⁰⁾ *E. J. Bourne*, *Sir Norman Haworth*, *A. Macey* et *S. Peat*, *Soc.* **1948**, 924.

de l' α -amylase de pancréas de porc, et son mode d'action sur l'amidon à celui d'autres α -amylases. Nous avons enfin examiné si l' α -amylase est le seul enzyme dans la salive agissant sur l'amidon ou sur ses produits de dégradation.

1° Propriétés de l'enzyme pur.

Nature protéique: L' α -amylase de salive humaine pure donne, entre autres, les réactions du biuret et de la ninhydrine; elle est coagulée à la chaleur et dénaturée irréversiblement par l'acide trichlor-acétique. Elle contient 15,8% d'azote. L' α -amylase de salive humaine est donc de nature protéique.

Teneur en phosphore: L'enzyme recristallisé trois fois contient 0,01% de phosphore. Pour que le phosphore fasse partie de la molécule de l'enzyme, ce dernier devrait donc avoir un poids moléculaire supérieur à 300 000. Or, nous pouvons déduire de ses propriétés (diffusion, limites de précipitation, etc.) que son poids moléculaire n'est pas supérieur à celui de l' α -amylase de pancréas de porc¹⁾ (45 000). Nous en concluons que la molécule d'amylase de salive humaine est exempte de phosphore.

Activité en fonction du p_H : L'enzyme pur est actif entre les p_H 3,8 et 9,4 (voir fig. 1). Il possède un net optimum d'activité au p_H 6,9.

Activité en fonction de la température: L' α -amylase de salive humaine pure possède un optimum d'action à 40° (voir fig. 2). Le coefficient de température est de 2,3 entre 10 et 20° et de 2,0 entre 20 et 30°.

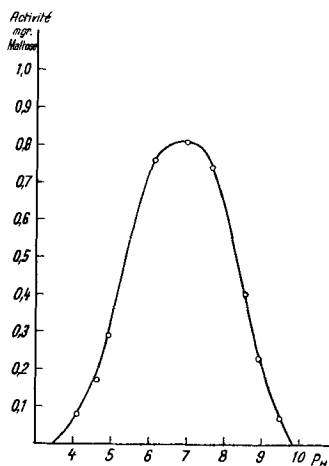


Fig. 1.

Activité de l' α -amylase de salive humaine pure en fonction du p_H .

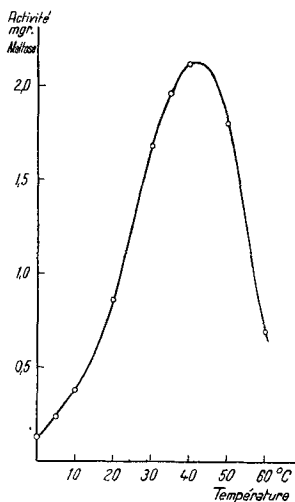


Fig. 2.

Activité de l' α -amylase de salive humaine pure en fonction de la température.

¹⁾ C. E. Danielsson, Nature **160**, 899 (1947).

Activité en fonction de la teneur en sels: En dialysant une solution d' α -amylase de salive pure pendant plusieurs jours à 2° contre de l'eau ammoniacale (p_H entre 9 et 10) on arrive à réduire l'activité amylique à environ 15% de sa valeur initiale. Le dosage d'activité doit être effectué, dans ce cas, avec un substratum soigneusement dialysé et tamponné au phosphate 0,01-m. à p_H 6,9. Cette désactivation est réversible. Si l'on effectue le dosage en présence de 0,01-m. ClNa, l'activité initiale de l'enzyme est entièrement rétablie, alors que 75 à 85% de l'activité sont récupérés par la présence de 0,001-m. ClNa. Dans tous les cas, la réactivation est instantanée.

Conformément aux indications de la littérature, la réactivation par le ClNa est due aux ions chlore seulement. Les sels suivants possèdent, à concentrations équivalentes en chlore, le même effet sur l' α -amylase de salive pure et dialysée: ClNa, ClK, ClNH₄, Cl₂Mg et Cl₂Ca. L'effet activateur n'est pourtant pas spécifique à l'ion chlore; d'autres anions le produisent, quoique plus faiblement. Ce sont, dans l'ordre décroissant de leur capacité de réactiver l'amylase salivaire: Cl' > Br' > NO₃' > I'. Les anions suivants ne possèdent, au contraire, aucune action activatrice: SO₄'', CO₃H', PO₄H'', CNS' et CH₃COO'.

Tableau 1.

Sel ajouté	Conc. molaire du sel ajouté dans le mélange de réaction	Activité trouvée	
		en mgr. de maltose	en % de l'activité maximum
—	—	0,25	14
ClNa	0.01 m.	1,75	100
ClNa	0,001 m.	1,4	80
ClK	0,001 m.	1,4	80
ClNH ₄	0,001 m.	1,4	80
Cl ₂ Mg	0,0005 m.	1,4	80
Cl ₂ Ca	0,0005 m.	1,4	80
BrK	0,001 m.	1,0	57
IK	0,001 m.	0,45	26
NO ₃ K	0,001 m.	0,6	34
CNSK	0,001 m.	0,3	17
CH ₃ CO ₂ K . .	0,001 m.	0,3	17
CO ₃ HK . . .	0,0005 m.	0,25	14
SO ₄ K ₂ . . .	0,0005 m.	0,25	14

Stabilité: Les solutions aqueuses d' α -amylase de salive humaine pure sont très stables. A 20°, aucune perte d'activité ne peut être observée entre les p_H 4,5 et 11 pendant plus de 20 heures (voir fig. 3). Après 6 jours, 95% de l'activité sont conservés dans les mêmes condi-

tions. En outre, l'enzyme ne perd aucune activité par dialyse contre de l'eau au p_H 7,3 et à 2° , à condition toutefois que le dosage d'activité soit effectué en présence de $ClNa$ (voir plus haut).

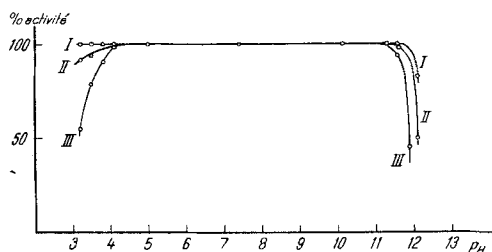


Fig. 3.

Stabilité de l' α -amylase de salive humaine pure à $20^\circ C$ en fonction du p_H
I après 30 minutes II après 2 heures III après 20 heures.

La solubilité de l'enzyme cristallisé dans l'eau ajustée au p_H 8,5 par de l'ammoniaque, a été déterminée en partant de solutions sous-saturées et sursaturées. A 2° , elle est d'environ 0,3%. Sa solubilité au p_H 10 est sensiblement plus forte (entre 3 et 5%).

Mobilité électrophorétique: L' α -amylase de salive humaine possède une mobilité électrophorétique de $3,75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$ au p_H 10,14.

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet de l'enzyme pur a été déterminé (voir fig. 4). Il montre un maximum à $280 \text{ m}\mu$ et un point d'inflexion à $292 \text{ m}\mu$.

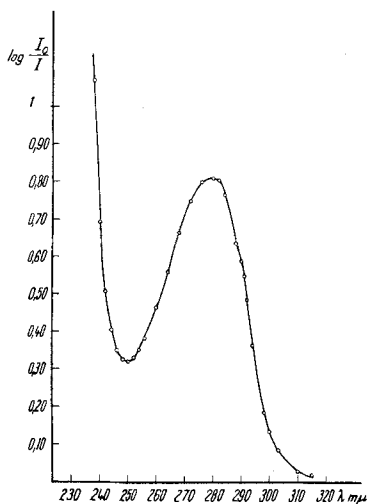


Fig. 4.

Spectre d'absorption de l' α -amylase de salive humaine pure déterminé au «Beckman photoelectric quartz spectro-photometer».
 $c = 0,137 \text{ mgr. substance par cm}^3$; cuves: 1 cm. d'épaisseur.

1^o Comparaison entre les α -amylases de salive humaine et de pancréas de porc cristallisées.

Le tableau 2 résume et compare les principales propriétés de l'amylase de salive humaine avec celles de l'amylase de pancréas de porc.

Tableau 2.

	α -Amylase de salive humaine	α -Amylase de pancréas de porc ¹⁾
Activité par mgr. d'azote	6400 mgr. de maltose	4000 mgr. de maltose
Activité par mgr. d'enzyme pur . . .	1000 mgr. de maltose	630 mgr. de maltose
Teneur en azote	15,8%	15,8%
Teneur en phosphore	0,01%	< 0,05%
Optimum d'action	p _H 6,9	p _H 6,9
Zone de stabilité	entre p _H 4,5 et 11	entre p _H 7 et 8,5
Solubilité dans l'eau à 2 ^o et au p _H 8,7	~ 0,3%	6 à 6,5%
Mobilité électrophorétique au p _H 10,1	3,75 · 10 ⁻⁵	3,55 · 10 ⁻⁵
Spectre d'absorption:	cm ² · sec ⁻¹ · volt ⁻¹	cm ² · sec ⁻¹ · volt ⁻¹
maximum	280 m μ	280 m μ
palier	292 m μ	292 m μ
Quotient: $\frac{\text{pouvoir saccharogène}^2)}{\text{pouvoir dextrinogène}}$. .	9,5 ± 0,2	9,8 ± 0,2

La comparaison entre ces deux amylases cristallisées montre tout d'abord qu'elles possèdent le même quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène. Leur mode d'action enzymatique est donc le même²⁾, identique d'ailleurs à celui des α -amylases de pancréas humain, de *B. subtilis* et de malt.

Les α -amylases de salive humaine et de pancréas de porc ont, en outre, la même teneur en azote. Elles ne contiennent que des traces de phosphore; elles donnent des spectres d'absorption très similaires et leur optimum d'action se trouve au même p_H. La différence entre la mobilité électrophorétique des deux enzymes dépasse à peine la limite d'erreur des mesures.

Par contre, ces deux amylases se distinguent très nettement l'une de l'autre par les faits suivants:

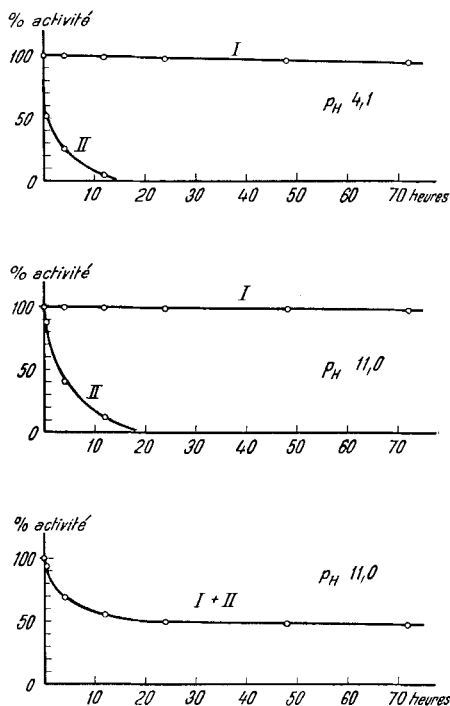
1^o L'activité enzymatique de l'amylase de salive humaine par poids de substance pure, est supérieure de 50% à celle de l'amylase de pancréas de porc.

2^o La première est environ 20 fois moins soluble dans l'eau au p_H 8,7 que la dernière.

¹⁾ Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **31**, 1831 (1948).

²⁾ P. Bernfeld et M. Fuld, *Helv.* **31**, 1423 (1948).

3° L'enzyme humain est beaucoup plus stable à certains p_H que l'enzyme de porc. Ces différences sont illustrées par les fig. 5 et 6 qui montrent l'activité de chacune de ces amylases en fonction du temps, aux p_H 4,1 et 11,0. On pourrait croire que la désactivation de l'amylase de porc, beaucoup plus rapide que celle de l'amylase humaine, est provoquée par une impureté accompagnant cet enzyme¹). Ceci n'est pas le cas comme le montre la courbe de l'activité en fonction du temps d'un mélange de ces deux amylases (voir fig. 7). Elle montre une rapide diminution de l'activité due à la désactivation de l'amylase de porc alors que l'activité provenant de l'enzyme humaine persiste.



Comparaison entre la stabilité des amylases de salive humaine et de pancréas de porc aux p_H 4,1 et 11,0 à 20° C.

I Amylase pure de salive humaine

II Amylase pure de pancréas de porc.

4° Alors que les électrophorèses de chacune des deux amylases donnent les diagrammes d'une substance homogène, l'électrophorèse de leur mélange montre, après 3 heures à 5,2 volts/cm. et au p_H 10,1, le début de la séparation des deux substances de mobilité très rapprochée.

Il en résulte que la constitution chimique de ces deux amylases est différente, mais que leur action enzymatique est identique.

¹) Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, *Helv.* **31**, 1839 (1948).

3° Action enzymatique de la salive brute.

Certains auteurs prêtent à la salive l'action de divers autres enzymes amylolytiques et nous ont amené à comparer l'action de l' α -amylase de salive humaine pure et cristallisée à celle de la salive brute. Or, le quotient: pouvoir saccharogène/pouvoir dextrinogène de la salive brute est identique à celui de l' α -amylase pure. La présence, dans la salive humaine, d'autres enzymes agissant sur l'amidon ou sur ses produits de dégradation, tels une β -amylase, une maltase ou un enzyme scindant les liaisons α -1,6-glucosidiques, est dès lors exclue. L'absence de la maltase a d'ailleurs été vérifiée directement; aucune augmentation du pouvoir réducteur n'a pu être décelée en faisant agir de la salive brute sur du maltose, au p_H 6,9, pendant 48 heures à 25°.

Partie expérimentale.

Solutions.

1° Solution d'amidon soluble *Zulkowski* à 2%.

2° Solution d'amylopectine dialysée à 3%: l'amylopectine de maïs est préparée selon la prescription de *Schoch*¹⁾. Elle est ensuite dialysée pendant 8 jours à 2° contre de l'eau distillée. L'eau de dialyse est renouvelée deux fois par jour.

3° Solutions de tampon acétate, p_H 3,2; 3,5; 3,8; 4,1; 4,6; 5,0 et 6,2. Chaque solution est en outre 0,05-m. en $ClNa$ et de force ionique $\mu = 0,15$.

4° Solutions de tampon phosphate, p_H 6,1; 6,9 et 7,6. Chaque solution est en outre 0,05-m. en $ClNa$ et de force ionique $\mu = 0,30$.

5° Solutions de tampon véronal acétate, p_H 6,1; 7,4 et 8,55. Chaque solution est en outre 0,05-m. en Cl' et de force ionique $\mu = 0,15$.

6° Solutions de tampon glycocolle, p_H 8,55; 10,1; 11,55 et 12,1. Chaque solution est en outre 0,05-m. en Cl' et de force ionique $\mu = 0,15$.

7° Solution de tampon phosphate p_H 6,9 *sans* $ClNa$ et de force ionique $\mu = 0,005$.

8° Solution d' α -amylase de salive humaine pure: l'enzyme deux fois recristallisé est dissous au p_H 11 en présence de quelques gouttes de $NaOH$ 0,04-n.; la solution est ensuite neutralisée par CH_3COOH 0,04-n. et congelée rapidement à -70°. Après évaporation de la glace dans le vide à une pression de 0,01 mm. Hg, on obtient une poudre volumineuse, très facilement soluble dans l'eau. Des solutions de cet enzyme sont fraîchement préparées avant chaque essai.

9° Solution alcaline d'acide dinitrosalicylique: voir²⁾, solution 2.

Activité en fonction du p_H .

On mélange dans une éprouvette 0,5 cm³ de solution d'amidon 1, 0,5 cm³ de solution de tampon contenant $ClNa$ 3 à 6, selon le p_H désiré, et 1 cm³ de solution d'enzyme 8, contenant de 0,8 à 1,6 γ de protéine par cm³. Après 3 min. à 20° on ajoute 2 cm³ de 9 et on dose le pouvoir réducteur comme d'habitude³⁾. Les résultats sont donnés dans la fig. 1. En remplaçant une solution de tampon par une autre donnant le même p_H , les mêmes valeurs de réduction sont observées. La nature du tampon n'a donc aucune influence sur l'activité.

Activité en fonction de la température.

On mélange dans une éprouvette 0,5 cm³ de solution d'amidon 1, 0,5 cm³ de solution de tampon phosphate de p_H 6,9 contenant $ClNa$ 4 et 1 cm³ de solution d'enzyme 8

¹⁾ *Th. J. Schoch*, Am. Soc. **64**, 2957 (1942); *Advances in Carbohydrate Chemistry* **1**, 247 (1945).

²⁾ *Helv.* **31**, 288 (1948).

³⁾ *Helv.* **31**, 286 (1948).

contenant de 0,8 à 1,6 γ de protéine par cm^3 . Toutes ces solutions sont portées préalablement à la température voulue, c'est-à-dire à 0, 5, 10, 20, 30, 35, 40, 50 et 60°. On laisse réagir l'enzyme à cette température pendant 3 min., puis on ajoute 2 cm^3 de **9** et dose le pouvoir réducteur comme d'habitude¹). Les résultats sont donnés dans la fig. 2.

Activité en fonction de la teneur en ClNa et autres sels.

Une solution d'enzyme pur, contenant environ 3,5 mgr. de protéine par cm^3 , est dialysée pendant 17 jours à 2° contre de l'eau ajustée au p_H 9,4 par NH_4OH . L'eau de dialyse est renouvelée deux fois par jour. 1 cm^3 de cette solution est ensuite dilué à 1000 cm^3 par la solution de tampon phosphate de p_H 6,9 exempte de ClNa (**7**). A 0,5 cm^3 de cette solution tamponnée d'enzyme, dialysée, on ajoute 0,5 cm^3 de solution d'un sel ou d'eau, puis 1,0 cm^3 de solution d'amylopectine dialysée **2**. Après 3 min. à 20° on ajoute 2 cm^3 de **9** et on dose le pouvoir réducteur comme d'habitude. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

Stabilité.

On mélange dans une éprouvette 5 cm^3 de solution d'enzyme **8** contenant environ 30 γ de protéine par cm^3 avec 5 cm^3 de solution tampon **3** à **6**, selon le p_H désiré, puis on ajoute 5 gouttes de toluène et on garde le tube fermé dans un thermostat à 20°. Aux temps voulus, on prélève 1 cm^3 et dilue à 10 cm^3 par la solution de tampon phosphate **4** de p_H 6,9. Pour les p_H extrêmes, le p_H doit être ramené à 6,9 lors de la dilution par addition de NaOH ou de ClH. On détermine ensuite l'activité en faisant réagir 1 cm^3 de cette solution pendant 3 min. à 20° avec un mélange de 0,5 cm^3 de solution d'amidon **1** et de 0,5 cm^3 d'eau et en dosant la valeur de réduction comme d'habitude.

Les électrophorèses ont été effectuées comme décrit précédemment²).

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

RÉSUMÉ.

L' α -amylase de salive humaine est de nature protéique et ne contient pas de phosphore. L'enzyme pur est actif entre les p_H 3,8 et 9,4, avec un optimum d'activité au p_H 6,9. En fonction de la température, son activité montre un optimum à 40°. La présence de l'ion chlore est nécessaire à l'activité. Quelques autres anions exercent une action semblable quoique réduite. Ce sont dans l'ordre décroissant d'action: Br' , NO_3' et I' . L'enzyme pur est stable à 20° entre les p_H 4,5 et 11. Il n'est pas désactivé par la dialyse, pourvu que le dosage d'activité soit effectué en présence de ClNa.

L'action enzymatique de l' α -amylase de salive humaine est identique à celle de l' α -amylase de pancréas de porc, mais la constitution chimique de ces deux enzymes n'est pas la même, leurs mobilités électrophorétiques, leur stabilité en fonction du p_H , leur solubilité dans l'eau et leur activité par poids d'enzyme pur étant différentes.

L' α -amylase est le seul enzyme de la salive agissant sur l'amidon ou sur ses produits de dégradation.

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

¹) Helv. **31**, 286 (1948).

²) Helv. **31**, 1831 (1948).