

Säule von 9 ml Dowex 2 (OH-Form) gegeben und mit 15 ml Wasser durchgewaschen. Das zur Trockne eingedampfte farblose Eluat wurde in 10 Tropfen Wasser gelöst; 12 Aufträge dieser Lösung auf eine Fleckgröße von 4 mm Durchmesser auf WHATMANN-Papier 47×7 cm erwiesen sich als genügende Konzentration für eine eindeutige Identifikation. Im absteigenden Chromatogramm mit frisch angesetztem Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 zeigte sich nach einer Laufzeit von 14 Stunden nur ein Fleck $R_f = 0,20$ (entwickelt mit Anilinphtalat), welcher mit einem solchen von gleichzeitig wandernder *Glucose* identisch war.

SUMMARY

The major red-violet pigment of *Phytolacca decandra* L. (pokeberry), called phytolaccanin, has been isolated and crystallized. The elementary analysis, the UV-, visible and IR.-spectra and the electrophoretic as well as the chromatographic behaviour on paper indicated its identity with betanin, the pigment of the red beet.

This conclusion was confirmed by the acid hydrolysis of phytolaccanin which yielded a crystalline aglucone, identified as a mixture of betanidin and isobetanidin hydrochlorides by its spectra, its x-ray powder diagram and other analyses.

Besides betanin, which accounts for more than 95% of the red pigment, the pokeberry was found to contain small amounts of three other pigments which are probably isobetanin, prebetanin and isoprebetanin.

Zürich, Organisch-Chemisches Institut der Universität

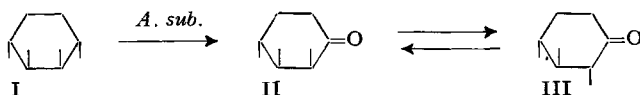
31. Sur une δ -lactono-épimérase I¹⁾.

Préparation et propriétés

par Th. Posternak et P. Waegell

(7 XII 60)

Il y a quelques années, POSTERNAK & REYMOND²⁾ montrèrent qu'*Acetobacter suboxydans*, souche KLUYVER & DE LEEUW, contient un ferment en présence duquel s'effectue la réaction suivante: la trihydroxy-2,3/4-cyclohexanone (II), formée sous l'action du microorganisme par déshydrogénation du cyclohexanetetrol-2,3/1,4 (dihydroconduritol) (I), est épimérisée d'une manière réversible en trihydroxy-3/2,4-cyclohexanone (III). Ce ferment (épimérase) a été retrouvé dans deux autres souches d'*A. suboxydans*, qui diffèrent d'ailleurs considérablement de la première souche par leur capacité de déshydrogénation des cyclitols. L'enzyme passe assez facilement en solution; il est présent dans les extraits acellulaires des microorganismes.



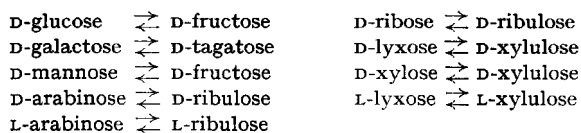
Les trihydroxycyclohexanones II et III n'étant pas des substances naturelles, il était probable que les réactions observées résultaient d'un défaut de spécificité de

¹⁾ Communication préliminaire: IV. Congr. Int. Biochim.; résumés des communications, 52 (1958).

²⁾ TH. POSTERNAK & D. REYMOND, *Helv.* 38, 195 (1955).

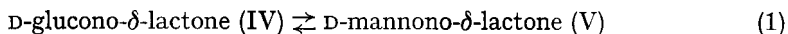
l'enzyme. Reprenant cette étude, nous nous sommes proposé de caractériser cette épimérase d'*A. suboxydans*, de l'identifier éventuellement à un ferment connu et, s'il devait s'agir d'un nouvel enzyme, de trouver ses substrats naturels d'intérêt biologique.

A. suboxydans contient une phosphohexose-isomérase³⁾. Nous avons constaté qu'on peut obtenir des préparations de ce ferment dépourvues d'action d'épimérase: il ne s'agit donc pas du même enzyme. La phosphohexose-isomérase du muscle n'agit d'ailleurs pas non plus, comme nous l'avons observé, sur les trihydroxycyclohexanones II et III. Examinant ensuite divers substrats pouvant entrer en ligne de compte, nous avons constaté par des réactions colorées à la cystéine-carbazole⁴⁾ que des extraits d'*A. suboxydans* n'effectuent pas, tout au moins à des pH compris entre 5,4 et 8,2, les interconversions suivantes d'aldose en cétose dont certaines ont été observées avec d'autres microorganismes:



Par chromatographie sur papier, on ne constate d'autre part ni épimérisation du D-ribulose en D-xylulose, ni isomérisation du D-glucose en D-mannose. Signalons qu'*A. suboxydans* contient par contre les isomérases qui interviennent dans le cycle des pentoses⁵⁾.

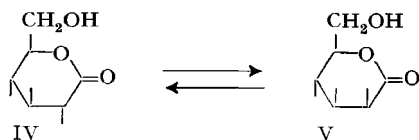
Par chromatographie sur papier, nous avons observé par contre que les extraits d'*A. suboxydans* catalysent l'épimérisation réversible suivante d'intérêt biologique:



Les extraits du microorganisme contiennent ainsi un enzyme nouveau, une δ -lactono-épimérase, qui, par l'intermédiaire des lactones, réalise indirectement l'épimérisation des acides aldoniques que les chimistes effectuent *in vitro* par traitement au moyen des bases.

Nos préparations enzymatiques n'effectuent pas d'épimérisation aux dépens des sels des acides D-mannonique et D-gluconique. Elles n'agissent d'autre part ni sur la γ -lactone mannonique, ni sur les autres lactones suivantes: phospho-6-D-glucono- δ -lactone, D-xylono- δ -lactone, D-arabo- δ -lactone, D-lyxono- δ -lactone, D-ribono- δ -lactone.

Vu cette spécificité étroite de la lactono-épimérase, l'action sur les trihydroxycyclohexanones, qui est probablement due au même ferment, est d'autant plus remarquable; notons cependant la parenté stéréochimique des 2 types d'épimérisation: dans chacune des deux paires de substrats II, V et III, IV, on trouve le même groupement de 3 carbones asymétriques voisins faisant partie d'un cycle à 6 atomes et voisins d'un groupe carbonyle.



³⁾ J. G. HAUGE, T. E. KING & V. H. CHELDELIN, J. biol. Chemistry 214, 11 (1955).

⁴⁾ Z. DISCHE & E. BORENFREUND, J. biol. Chemistry 192, 583 (1951).

⁵⁾ P. A. KITOS, CH. H. WANG, B. A. MOHLER, T. E. KING & V. H. CHELDELIN, J. biol. Chemistry 233, 1295 (1958).

Pour la détection qualitative de ces épimérisations, nous avons séparé par chromatographie sur papier les sels d'ammonium des acides formés par hydrolyse des lactones; le système de dissolvants employé était le suivant: acétate d'éthyle-pyridine- NH_3 conc.- H_2O (5:3:1:1 en vol.). Les produits d'épimérisation des lactones gluconique et mannonique, décelés pour commencer par chromatographie sur papier, ont pu ensuite être isolés sous forme des acides correspondants par application des méthodes d'E. FISCHER⁶⁾. L'acide D-gluconique formé à partir de la D-mannono- δ -lactone a été séparé par l'intermédiaire des sels de brucine et de cinchonine; de même, l'acide D-mannonique formé aux dépens de la D-glucono- δ -lactone a été isolé comme sel de brucine. Les deux acides ont été finalement caractérisés sous forme de phénylhydrazides.

Pour le dosage des mélanges des acides gluconique et mannonique, on pourrait sans doute utiliser une méthode enzymatique basée sur l'emploi d'une gluconokinase. Pour des raisons évidentes de commodité, nous avons préféré une méthode purement physico-chimique. On sait que les acides D-gluconique et D-mannonique, à l'instar

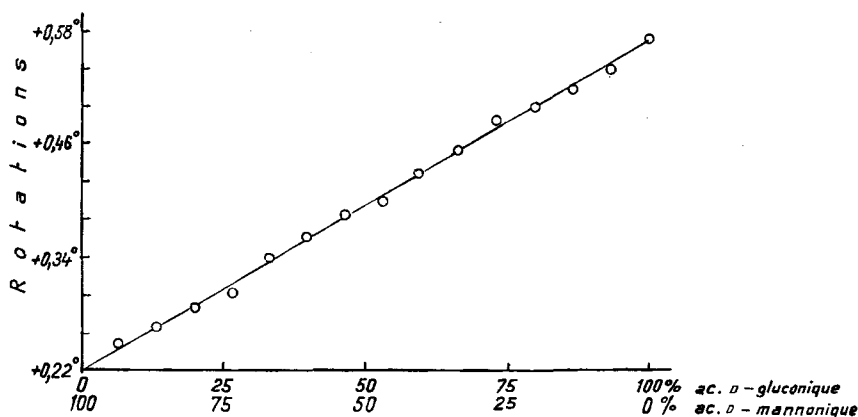


Fig. 1. Rotations des complexes molybdiques de mélanges d'acides D-gluconique et D-mannonique. Tube polarimétrique de 2 dm. Mélanges des deux acides de concentration totale 0,077% ayant subi les traitements indiqués dans la partie expérimentale (voir dosage d'activité).

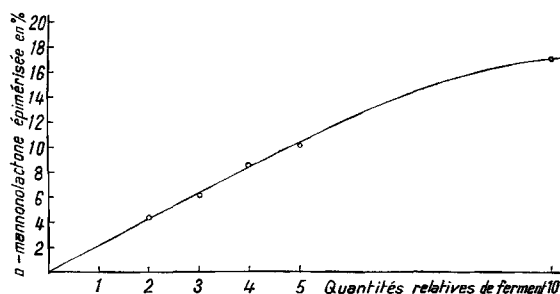


Fig. 2. Epimérisation de la D-mannono- δ -lactone en présence de quantités croissantes de ferment. Concentrations initiales: mannonolactone $9,36 \cdot 10^{-3}\text{M}$, tampon acétate 0,17–0,20M de pH 5,1, ZnCl_2 $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$; température 32° ; durée d'incubation 10 min.

⁶⁾ E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. 23, 799 (1890).

d'autres acides α -hydroxylés, forment avec le molybdate d'ammonium des complexes de rotations spécifiques élevées⁷⁾. Dans les conditions expérimentales employées, nous trouvons pour l'acide gluconique complexé $[\alpha]_D = +374^\circ$ et pour l'acide mannonique complexé $[\alpha]_D = +148^\circ$. Les rotations sont assez différentes pour permettre, après hydrolyse complète de leurs lactones, le dosage de mélanges des deux acides. La figure 1 montre en effet la relation linéaire existant entre la rotation et la composition de ces mélanges.

La δ -lactono-épimérase d'*A. suboxydans* est un enzyme soluble non particulaire; en effet, après 2 h de centrifugation à 40000 tours/min (Spinco) l'activité enzymatique reste complètement dans le liquide surnageant. Le ferment a été partiellement purifié par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium à 0,4–0,7 saturation, suivie de dialyse. Les préparations enzymatiques ainsi obtenues, quoique encore très impures, ont permis toutefois d'effectuer les quelques observations suivantes.

Le pH optimum d'épimérisation de la mannonolactone est compris entre 5,1 et 5,2 (tampon acétate 0,17M; température 32°).

Dans les conditions décrites dans la légende de la fig. 2, il y a proportionnalité entre les quantités de ferment et le pourcentage de mannonolactone épimérisée. On peut introduire alors l'unité enzymatique suivante: quantité de lactono-épimérase présente par ml (concentrations initiales: mannonolactone $9,36 \cdot 10^{-3}$ M, ZnCl_2 $2 \cdot 10^{-4}$ M; tampon acétate 0,17M de pH 5,1; temp. 32°) qui, en 10 min, provoque l'épimérisation de 0,1% de la mannonolactone primitivement présente.

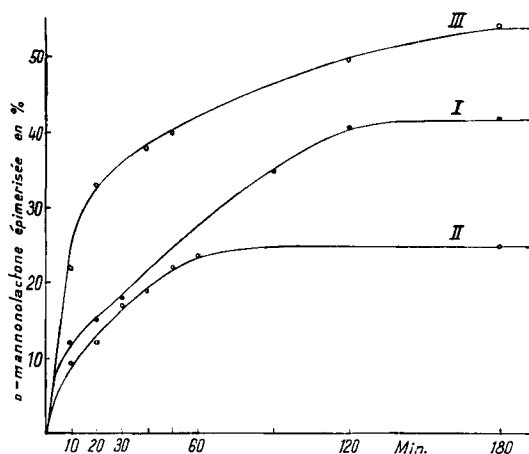


Fig. 3. Epimérisation de la D-mannono- δ -lactone par diverses préparations enzymatiques.

Concentrations initiales:

mannonolactone $9,36 \cdot 10^{-3}$ M, tampon acétate 0,17M de pH 5,1; température 32°.

Courbe I: Ferment fraction 0,4–0,7 sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,83 mg protéine par ml).

Courbe II: Même préparation d'enzyme qu'en I, mais dialysée (1,83 mg protéine par ml).

Courbe III: Même préparation d'enzyme qu'en I, mais dialysée (1,83 mg protéine par ml); ZnCl_2 $2 \cdot 10^{-4}$ M.

⁷⁾ TH. A. BENNET-CLARK, Biochem. J. 28, 45 (1934); TH. SCHMIDT & C. C. WEBER-MOLSTER, Liebigs Ann. Chem. 515, 65 (1935).

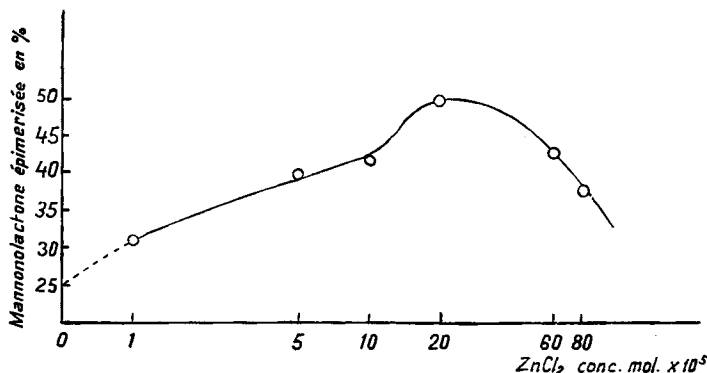


Fig. 4. *Epimérisation de la mannonolactone en présence de concentrations variables en Zn^{++} .*
Concentrations initiales: mannonolactone $9,36 \cdot 10^{-3} M$, tampon acétate $0,17 M$ de pH 5,1, $ZnCl_2$ de concentrations variables; température 32° ; durée d'incubation 120 min.

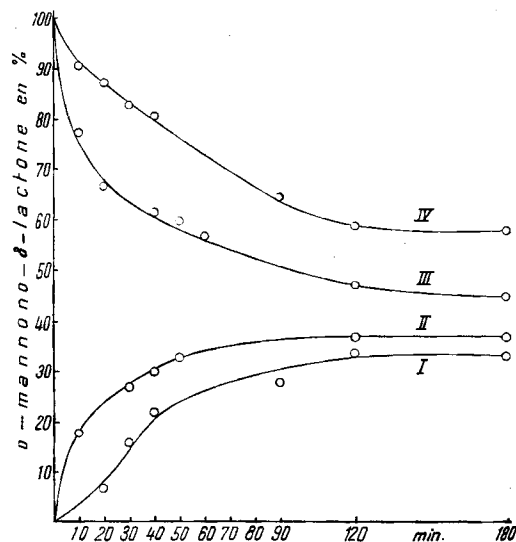


Fig. 5. *Epimérisation de la D-gluconolactone (I et II) et de la D-mannonolactone (III et IV).*
Concentrations initiales: gluconolactone (I et II) et mannonolactone (III et IV) $9,33 \cdot 10^{-3} M$, tampon acétate $0,17 M$ de pH 5,1; température 32° .

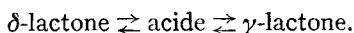
Courbes I et IV: Ferment fraction 0,4–0,7 sat. $(NH_4)_2SO_4$ (2,83 mg protéine par ml).

Courbes II et III: Même préparation enzymatique qu'en I et IV, mais dialysée (1,83 mg protéine par ml); $ZnCl_2$ $1 \cdot 10^{-4} M$.

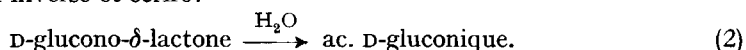
Lors des essais de purification de l'enzyme, nous avons constaté que des précipitations répétées au moyen de sulfate d'ammonium, ou encore la dialyse, abaissent la vitesse de réaction (courbes I et II de la fig. 3); cet effet se fait sentir surtout dans les stades finals de réaction. On observe la même inhibition en présence d'éthylène-diamine-tétraacétate $1 \cdot 10^{-3} M$ ou de $NaCN$ $1 \cdot 10^{-2} M$. On pouvait ainsi envisager l'action activante d'ions métalliques sur l'épimérase. L'effet de divers métaux sur l'épimérisation de la mannonolactone a donc été essayé. Alors que les ions Fe^{+++} , Fe^{++} ,

Ca^{++} , Cu^{++} , Mg^{++} et K^{+} sont inactifs, on constate que les ions Zn^{++} (fig. 3) et, à un degré un peu moindre, les ions Mn^{++} , exercent une action favorable. La concentration optimum en Zn^{++} , et aussi en Mn^{++} , est de $2 \cdot 10^{-4}$ à $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (fig. 4). L'épimérisation de la gluconolactone est également activée par Zn^{++} à la même concentration optimum. On constate en outre qu'en présence de la concentration optimum en Zn^{++} , le ferment est complètement inhibé par le TPN $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; le DPN $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ manifeste une action inhibitrice plus faible, l'inhibition dans les stades finals étant d'env. 50%.

On sait que les δ -lactones gluconique et mannonique s'hydrolysent spontanément en solution aqueuse neutre ou acide; le mélange en équilibre est composé d'acide, de δ -lactone et de γ -lactone:

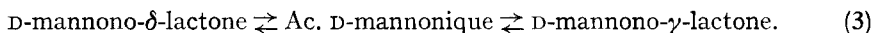


La D-glucono- δ -lactone a donné lieu à cet égard à quelques travaux. La vitesse d'hydrolyse est relativement grande et, si l'on se borne aux premiers stades, on peut négliger la réaction inverse et écrire:



Nous avons constaté que dans nos conditions expérimentales (pH 5,1, tampon acétate 0,17 M; concentration initiale en lactone $9,36 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; température 32°) il ne subsiste au bout de 24 h que 5% de lactone; la réaction inverse (lactonisation) apparaît ainsi effectivement comme négligeable. On observe une réaction d'hydrolyse de premier ordre, de constante de vitesse $K_1 = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. On sait que la vitesse d'hydrolyse est fortement influencée par les électrolytes et varie par conséquent à pH et température constants avec la composition du tampon. Pendant que ces travaux étaient en cours, d'autres auteurs⁸⁾, opérant dans des conditions différentes des nôtres, ont publié des constantes K_1 . Dans les conditions d'hydrolyse qui se rapprochent le plus des nôtres (tampon acétate 0,5 M de pH 5,2; température 30°), on a indiqué $K_1 = 1,48 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

Dans le cas de la D-mannono- δ -lactone la situation est moins simple. Dans les conditions expérimentales mentionnées, nous observons une courbe d'hydrolyse comportant un palier intermédiaire. Nous ne pouvons discuter ici en détail cette réaction dont la cinétique apparaît comme complexe. On sait toutefois que les réactions inverses (lactonisation) sont ici plus importantes que dans le cas de l'acide gluconique:



Pour avoir une valeur approchée de la constante K_1 , de vitesse d'hydrolyse de la δ -mannono-lactone, on peut théoriquement considérer les premiers stades de réaction et extrapoler au temps $t = 0$; on obtient ainsi pour K_1 env. $3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (concentration initiale en lactone $1,04 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, tampon acétate 0,183 M de pH 5,1; température 32°).

Il résulte de ce qui précède que la réaction enzymatique (1) est accompagnée de deux réactions non enzymatiques (2) et (3). Comme nous l'avons mentionné, les acides D-gluconique et D-mannonique, leurs sels et leurs γ -lactones formés ainsi aux dépens des substrats, ne sont pas transformés par l'épimérase. Par suite de la formation spontanée de ces composés, les deux courbes d'épimérisation en fonction du temps des δ -lactones ne peuvent se rejoindre, comme c'est le cas dans les réactions enzymatiques réversibles ordinaires; elles finissent par devenir parallèles à une distance d'autant plus petite que la réaction d'épimérisation est rapide par rapport à l'hydrolyse spon-

⁸⁾ D. T. SAWYER & J. B. BAGGER, J. Amer. chem. Soc. 81, 5302 (1959); M. A. JERMYN, Biochim. biophysica Acta 37, 78 (1960).

tanée. C'est la raison pour laquelle, en présence de ZnCl_2 $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$, les deux courbes se rapprochent davantage qu'en l'absence de cet activateur (fig. 5).

On constate, d'autre part, que, dans les conditions indiquées, l'épimérisation de la mannonolactone se fait plus facilement que celle de la gluconolactone: dans le premier cas, les vitesses initiales d'épimérisation sont env. 1,3 fois plus fortes. Ceci s'expliquerait peut-être par le fait que la mannono- δ -lactone, contrairement à son épimère, contient un hydroxyle axial et possède ainsi une teneur en énergie plus élevée. D'une manière analogue, l'épimérisation de la trihydroxycyclohexanone II qui possède un OH axial se fait plus facilement que celle de la substance III qui en est dépourvue²⁾.

Nous n'avons pu mesurer avec une précision suffisante la constante de MICHAELIS; la détermination de cette dernière aurait nécessité en effet des concentrations en substrat plus élevées que celles que nous utilisons, ce qui aurait exigé également des concentrations plus fortes en tampon; il en serait résulté une catalyse de l'hydrolyse spontanée des lactones, qui aurait compliqué singulièrement l'interprétation des résultats.

En ce qui concerne la signification physiologique de la δ -lactono-épimérase d'*Acetobacter suboxydans*, on pourrait faire les remarques suivantes:

Plusieurs souches du microorganisme sont capables de dégrader le mannose à des degrés divers. Nous avons constaté avec la souche KLUYVER & DE LEEUW que le D-glucose et le D-mannose peuvent, dans certain cas, donner lieu à des consommations finales d'oxygène du même ordre. On sait qu'un des produits formés à partir du mannose est l'acide 2-cétogluconique⁹⁾, qui prend également naissance à partir du glucose, mais on a montré que ce produit n'est probablement catabolisé qu'après réduction en acide gluconique¹⁰⁾. Comme CHELDELIN et coll.⁵⁾ l'ont constaté avec la souche ATCC 621, le glucose, et l'acide gluconique formé à ses dépens, sont dégradés essentiellement par le cycle des pentoses qui représente le processus majeur d'oxydation en milieu aérobie. La lactono-épimérase qui convertit la D-mannono- δ -lactone, produit primaire de l'oxydation du D-mannose, en D-glucono- δ -lactone, permettrait ainsi au mannose d'être dégradé d'une façon plus directe par le cycle des pentoses.

Nous remercions vivement la maison HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, Bâle, de l'envoi de deux souches d'*Acetobacter suboxydans*, et M. le Dr CH. HERSCHMANN (Labor. de Chimie physique de l'Université de Genève, Dir. Prof. B. SUSZ), de la détermination des spectres IR.

Partie expérimentale

Substances employées: Les trihydroxycyclohexanones II et III ont été préparées par oxydation biochimique du cyclohexanetetrol-1,4/2,3²⁾. Le D-ribulose a été préparé suivant REICHSTEIN¹¹⁾; on a obtenu le D-xylulose par oxydation du D-arabitol au moyen d'*A. suboxydans*¹²⁾.

Pour la préparation de la D-mannono- δ -lactone (V), on a procédé comme suit: du D-mannonate de baryum amorphe, préparé suivant MOORE & LINK¹³⁾, a été transformé en acide libre qu'on convertit par évaporation à sec à un mélange de δ - et γ -lactones. Celui-ci est recristallisé dans l'alcool absolu bouillant et converti ensuite en sel de sodium par titration au moyen de NaOH. Après évaporation à sec, on dissout à froid dans 1 partie d'eau et additionne de 10 parties

⁹⁾ K. BERNHAUER & H. KNOBLOCH, Biochem. Z. 303, 308 (1940).

¹⁰⁾ J. DE LEY & A. J. STOUTHAMER, Biochim. biophysica Acta 34, 171 (1959).

¹¹⁾ T. REICHSTEIN et coll., Helv. 17, 996 (1934); 18, 80 (1935).

¹²⁾ R. M. HAHN, E. B. TILDEN & C. S. HUDSON, J. Amer. chem. Soc. 60, 1201 (1938).

¹³⁾ S. MOORE & K. P. LINK, J. biol. Chemistry 133, 293 (1940).

d'acide acétique¹⁴). Les cristaux de δ -lactone sont essorés après séjour d'une nuit à la glacière, soigneusement desséchés et recristallisés dans 100 parties d'alcool; F. 162–164°; $[\alpha]_D^{20} = +118^\circ$.

La D-mannono- γ -lactone a été préparée par évaporation lente au bain-marie d'une solution d'acide mannonique libre¹⁵).

La 6-phosphogluconolactone s'obtient en solution à partir du sel de potassium de l'acide glucose-6-phosphorique par traitement au moyen du brome dans un tampon acétate de pH 5,7; le pH est maintenu à 5,5 par addition de soude caustique et le brome en excès est éliminé finalement par courant gazeux¹⁶). Par oxydation des sucres pyraniques correspondants, nous avons préparé d'une manière analogue des solutions des δ -lactones D-xylonique, D-lyxonique et D-arabonique.

Toutes les autres substances employées étaient des produits commerciaux.

Méthodes colorimétriques: Pour déceler et doser les cétooses éventuellement formés par isomérisation enzymatique d'aldoses ou par épimerisation à partir d'autres cétooses, nous avons employé la méthode au réactif cystéine-carbazole⁴) avec les modifications indiquées pour les dosages du ribulose et du xylulose¹⁷).

Le dosage des protéines a été effectué d'après LOWRY et coll.¹⁸).

Méthodes chromatographiques: Pour déceler et séparer les mélanges de sucres réducteurs éventuellement formés sous l'action de l'enzyme, nous avons opéré généralement sur papier WHATMAN N° 1 dans le système phénol-H₂O; révélation des aldoses et des cétooses par la benzidine¹⁹), révélation spécifique des cétooses par le réactif orcinol – acide trichloracétique²⁰). Pour la détection du mélange mannose-glucose, on peut par contre utiliser le système acétone-H₂O 78:22. Au bout de 10 h les migrations sont: glucose 24 cm, mannose 26 cm; révélation au moyen du réactif de TOLLENS.

Pour déceler les lactones d'acides oniques, ou plus exactement les acides dont elles dérivent, on opère avantageusement de la manière suivante: le mélange est additionné de 1 vol. de NH₄OH 2N; on chauffe 30 s à ébullition pour convertir en sel d'ammonium et reporte sur la ligne de départ du papier WHATMAN N° 1 des quantités correspondant à 30–35 γ de lactone primitive. Système acétate d'éthyle – pyridine – NH₄OH conc. – H₂O (5:3:1:1 en vol.); chromatographie descendante (Durchlauf) de 35–45 h; révélation par le réactif de TOLLENS. Le tableau suivant indique quelques séparations de couples d'acides oniques.

Mélange des sels d'ammonium	Durée de la chromatographie en h	Distances parcourues par les taches en cm	
		sel A	sel B
Gluconate (A) + mannonate (B)	41	7,3	10,6
Galactonate (A) + talonate (B)	36	5,5	7,0
Ribonate (A) + arabonate (B)	36	8,5	12,0
Xylonate (A) + Lyxonate (B)	41	5,0	7,5

Pour déceler une épimerisation éventuelle de la 6-phosphogluconolactone sous l'action du ferment d'*A. suboxydans*, on a procédé comme suit: Après incubation à pH 5,7, les composés sont déphosphorylés par de la phosphatase prostatique dialysée (257 P.E.²¹) dans un volume total de 1,75 ml); les produits de déphosphorylation sont analysés par chromatographie sur papier. Lors de l'expérience, on n'a pu déceler que de l'acide gluconique.

¹⁴) J. M. BRACKENBURY & F. W. UPSON, J. Amer. chem. Soc. 55, 2512 (1933); 56, 2659 (1934).

¹⁵) J. U. NEF, Liebig's Ann. Chem. 403, 305, 308 (1914).

¹⁶) B. L. HORECKER & P. Z. SMYRNIOTIS, Biochim. biophysica Acta 72, 98 (1953).

¹⁷) P. K. STUMPF & B. L. HORECKER, J. biol. Chemistry 218, 755 (1956).

¹⁸) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

¹⁹) Cf. F. CRAMER, Papierchromatographie, Verlag Chemie, 2^e éd. (1953), p. 70.

²⁰) R. KLEVESTRAND & A. NORDAL, Acta chem. scand. 4, 1320 (1950).

²¹) H. ALBERS & E. ALBERS, Z. physiol. Chem. 232, 179 (1935).

Cultures: Nous avons travaillé essentiellement avec *A. suboxydans*, souche KLUYVER & DE LEEUW; des essais préliminaires ont montré que deux autres souches mises à notre disposition par la maison HOFFMANN-LA ROCHE S. A. contiennent, elles aussi, le ferment qui épimérise les trihydroxycyclohexanones alors que, contrairement à la première souche, elles sont incapables d'oxyder des cyclitols supérieurs contenant au moins 4 hydroxyles voisins. Les cultures ont été effectuées sur un milieu à base de sorbitol comme décrit précédemment²²). Les bactéries recueillies par centrifugation à la SHARPLES (30000 t/min) sont lavées deux fois avec NaCl à 0,9%. On effectue encore deux autres lavages à 4° (centrifugeuse SERVALL 6000 t/min.) au moyen d'un tampon acétate M/15 de pH 5,0–5,5. Si l'on n'a pas l'intention d'effectuer des dosages polarimétriques en présence de molybdate, on peut aussi employer du tampon phosphate M/15 de pH 6,0.

Extraction et purification du ferment^{22a}): Pour ces opérations, on peut partir de bactéries soit fraîches, soit desséchées par lyophilisation et conservées à –15°. 20 g (poids sec) de micro-organismes sont broyés 5 min avec de l'alumine Alcoa 301 de l'ALUMINIUM CO. OF AMERICA, en principe suivant les indications de CHELDELIN²³). On extrait ensuite au moyen d'un tampon acétate M/15 de pH 5,1 ou 5,50; le broyage et l'extraction sont répétés. Les extraits réunis (250–260 ml) sont fractionnés au moyen de sulfate d'ammonium; on recueille par centrifugation la fraction précipitant à 0,40–0,70 saturation; elle est redissoute dans le minimum d'eau bidistillée et éventuellement soumise à un nouveau fractionnement par le sulfate d'ammonium. La fraction 0,40–0,70 saturation, redissoute dans l'eau, est finalement soumise à une dialyse de 6 h, à 4°, contre une vingtaine de volumes d'eau bidistillée. Les préparations les plus actives que nous ayons obtenues contenaient 130 unités par mg de protéine, ce qui correspondrait à un enrichissement de 4–5 fois par rapport à l'extrait primitif; le rendement en activité enzymatique totale récupérée est presque quantitatif.

Dosage d'activité: On prépare une solution à 0,2% en substrat (glucono- ou mannono-lactone) en introduisant la substance solide dans du tampon acétate 0,2M de pH 5,1 (5 vol.), chauffé préalablement à 32°, puis on introduit 1 vol. de la solution d'enzyme et laisse à l'étuve à 32° en présence de toluène. Ces opérations doivent être effectuées aussi rapidement que possible pour éviter une hydrolyse spontanée du substrat. Au bout de temps déterminés, on prélève 2,4 ml de liquide qu'on introduit dans un tube à centrifuger contenant 0,2 ml HClO₄ 6,7N, on mélange soigneusement et centrifuge 2 h à 4° à la SERVALL à 13000 t/min. 0,9 ml du liquide surnageant, parfaitement limpide, est additionné de 0,125 ml de NaOH 5,5N; on maintient quelques secondes à l'ébullition pour hydrolyser les lactones présentes. Après refroidissement, on ajoute dans l'ordre 0,25 ml d'acide acétique glacial puriss., 0,01 ml d'une solution d'iode, 0,1–0,01N et 0,5 ml d'une solution de 16,55 g de molybdate d'ammonium puriss. dans 100 ml d'eau. L'addition d'iode a pour but d'empêcher la coloration bleue qui se produit rapidement dans certains cas et rend difficiles les lectures polarimétriques. Après centrifugation éventuelle, on effectue dès que possible les lectures polarimétriques dans un tube de 2 dm. On emploie comme solution de référence un mélange dépourvu de substrat ayant subi le même traitement que ci-dessus.

Les rotations spécifiques des deux acides complexés déterminées dans ces conditions sont les suivantes:

$$\text{acide D-mannonique } [\alpha]_D = +148^\circ \pm 2^\circ; \text{ acide D-gluconique } [\alpha]_D = +374^\circ \pm 4^\circ.$$

Comme le montre la figure 1, il est ainsi possible de doser des mélanges des deux lactones ou des deux acides. Si *a* désigne la rotation spécifique apparente, déterminée comme indiqué ci-dessus, d'une solution de D-gluconolactone soumise à l'action du ferment, la proportion épimérisée *p* est:

$$p = (374 - a)/226.$$

De même, si l'on part d'une solution de D-mannonolactone:

$$p = (a - 148)/226.$$

Isolement des produits d'épimérisation. Cet isolement a été effectué d'après la méthode de E. FISCHER⁶), basée essentiellement sur la séparation des acides gluconique et mannonique sous forme de sels de brucine. Comme l'a déjà indiqué NEF¹⁵), cette méthode n'est pas satisfaisante

²²) TH. POSTERNAK, A. RAPIN & A. L. HAENNI, *Helv.* 40, 1594 (1957).

^{22a}) Opérations effectuées à la chambre froide à +4°.

²³) T. E. KING & V. H. CHELDELIN, *Biochim. Biophysica Acta* 14, 108 (1954).

en raison de la tendance des sels de brucine des deux acides à former des cristaux mixtes, ce qui diminue considérablement les rendements en produits homogènes.

A) *Acide mannonique à partir de la gluconolactone*: 1,0 g de D-glucono- δ -lactone est traité à 32°, dans 600 ml d'une solution 0,166 M en tampon acétate (pH 5,15) et $2,2 \cdot 10^{-4}$ M en ZnCl_2 , par une préparation d'enzyme purifiée par précipitation au moyen de sulfate d'ammonium et dialysée (1,15 g de protéines). Au bout de 3 h, l'épimérisation atteint 37%. On maintient 10 min à l'ébullition. Après élimination des protéines par centrifugation, on fait passer sur une colonne de 200 g de Dowex-50 (forme H^+) de $48 \times 4,5$ cm. La solution est évaporée à sec dans le vide et maintenue 2 h sous vide poussé. On reprend par 11 ml d'eau, ajoute 25 ml d'alcool absolu et filtre les impuretés précipitées. On évapore de nouveau à sec, reprend par 8 ml d'eau, ajoute 3,0 g de brucine et fait bouillir 30 min. Après séjour d'une nuit à la glacière, on récupère 1,06 g de brucine. La solution est concentrée jusqu'à début de cristallisation; on reprend par 100 ml d'alcool absolu bouillant et recueille successivement, après refroidissement, 96 mg de gluconolactone n'ayant pas réagi et 130 mg de sels de brucine consistant essentiellement en mannonate. Les eaux-mères sont évaporées à sec; on reprend par 8 ml d'eau et traite à l'ébullition par la brucine (1,06 g récupéré précédemment). Après repos à la glacière et filtration de la brucine séparée, on évapore le filtrat à sec et obtient une 2^e fraction de 2 g. Pour isoler le mannonate, les sels de brucine sont soumis à des recristallisations successives dans 20–30 parties d'alcool à 95%. Pour suivre le cours de la séparation, de petites quantités des fractions obtenues sont décomposées par l'ammoniaque et les sels d'ammonium des acides oniques formés sont analysés par chromatographie sur papier. On obtient finalement 187 mg de mannonate pur de F. 200–205° (6%), mais des quantités considérables restent dans les autres fractions. Le mannonate est décomposé par addition de baryte jusqu'à alcalinité à la phénolphthaléine; après filtration de la brucine et extraction du filtrat par le chloroforme, les ions Ba^{++} sont éliminés par l'acide sulfurique. La solution d'acide libre concentrée à 0,6 ml est traitée 6 h au bain-marie bouillant par un mélange de 0,12 ml de phénylhydrazine et de 0,12 ml d'acide acétique à 50%. Après séjour à la glacière, il se sépare 51 mg de phénylhydrazide mannonique fondant, après recristallisation dans l'eau, à 213–215° et identifié par son spectre IR.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2$ Calc. C 50,34 H 6,34 N 9,78% Tr. C 50,30 H 6,32 N 9,93%

Dans un essai témoin, de la gluconolactone a été traitée par du ferment inactivé préalablement par une ébullition de 10 min. Les produits ont été soumis ensuite au même traitement que ci-dessus. On ne put isoler ni déceler par chromatographie d'acide mannonique, qui ne se forme donc pas en quantité notable dans ces conditions: il était nécessaire de s'en assurer en raison d'une indication de FISCHER⁶⁾, d'après laquelle un traitement prolongé par la brucine à chaud pourrait provoquer une faible épimérisation.

B) *Acide gluconique à partir de la mannonolactone*: 500 mg de mannono- δ -lactone dissous dans 250 ml de tampon acétate 0,2 M de pH 5,6 sont traités 2 h à 32° par 50 ml d'extrait brut de bactéries (785 mg de protéines). Après ébullition, passage sur colonne de Dowex-50 et traitement par la brucine (1,8 g) comme décrit ci-dessus, on isole 1,30 g de sel de brucine peu soluble dans l'alcool représentant essentiellement du mannonate non épimérisé. Les sels de brucine plus solubles sont décomposés par l'hydroxyde de baryum; après précipitation des ions Ba^{++} comme sulfate, on traite à l'ébullition durant 30 min par 350 mg de cinchonine et obtient 137 mg de gluconate de cinchonine peu soluble dans l'alcool froid (rendement 10%). Ce sel est transformé, comme décrit ci-dessus, en phénylhydrazide gluconique de F. 198–200°, identifié par son spectre IR.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2$ Calc. C 50,34 H 6,34 N 9,78% Tr. C 50,74 H 6,43 N 9,75%

Dans un autre essai, les produits obtenus après passage sur la colonne de Dowex-50 ont été transformés en sels d'ammonium qui ont été séparés par chromatographie préparative sur papier de 175 h (papier WHATMAN N° 1; acétate d'éthyle – pyridine– NH_4OH conc. – H_2O 5:3:1:1). Après élution par l'eau des bandes contenant le gluconate et nouveau passage sur Dowex-50, on transforme directement en sel de cinchonine.

Etudes des vitesses d'hydrolyse des D-mannono- et D-glucono- δ -lactones. L'étude de l'hydrolyse spontanée en fonction du temps de ces lactones a été effectuée dans des conditions analogues à celles employées pour les essais enzymatiques: concentration initiale en lactone $0,93 \cdot 10^{-2}$ – $1,05 \cdot 10^{-2}$ M; tampon acétate 0,17–0,18 M de pH 5,1; température 32°. Les résultats ont été indiqués dans la partie théorique. Les mesures ont été effectuées occasionnellement par la méthode

polarimétrique⁸⁾, mais en général nous avons procédé par la méthode à l'acide hydroxamique selon HESTRIN²⁴⁾ pour doser la lactone restante; cette méthode ne permet pas de distinguer les γ - et δ -lactones. 0,4 ml du liquide d'hydrolyse + 0,6 ml H₂O sont introduits rapidement dans 2 ml du réactif alcalin à l'hydroxylamine; on procède ensuite comme indiqué par l'auteur.

RÉSUMÉ

A partir de trois souches d'*Acetobacter suboxydans* on obtient des extraits acellulaires contenant un ferment non particulaire qui permet l'interconversion de la trihydroxy-2,3/4-cyclohexanone et de la trihydroxy-3/2,4-cyclohexanone. Les mêmes préparations épimérisent d'une manière réversible la D-glucono- δ -lactone en D-mannono- δ -lactone. Cette δ -lactono-épimérase de pH optimum 5,1–5,2 est activée par les ions Zn⁺⁺ et Mn⁺⁺; son action est limitée par l'hydrolyse spontanée des deux lactones, car le ferment n'agit pas sur les acides correspondants. Une méthode polarimétrique a été utilisée pour le dosage des produits d'épimérisation.

La signification biologique de ce ferment a été discutée.

Genève, Laboratoires de Chimie biologique
et organique spéciale de l'Université

²⁴⁾ S. HESTRIN, J. biol. Chemistry 180, 250 (1949).

32. Sur une δ -lactono-épimérase II.

Mécanisme d'action

par Th. Posternak et P. Waegell

(7 XII 60)

Dans la communication précédente¹⁾ nous avons montré l'existence chez *Acetobacter suboxydans* d'une δ -lactono-épimérase qui effectue l'interconversion de la D-mannono- δ -lactone et de la D-glucono- δ -lactone. Dans le présent article nous discutons le mécanisme de cette épimérisation.

Les travaux publiés jusqu'à présent sur les épimérases permettent d'envisager deux types de mécanisme d'action pour ces ferments:

A) Par intervention d'enzymes à base de DPN ou de TPN, le carbone asymétrique porteur d'un groupement d'alcool secondaire pourrait subir une déshydrogénation avec formation d'un carbonyle. Ce dernier serait ensuite hydrogéné avec formation de l'épimère. Ce type de réaction n'implique pas d'échange de l'hydrogène fixé au carbone asymétrique contre l'hydrogène de l'eau du milieu. Il a été rendu probable, dans le cas de la galactowaldénase (UDP-galactose-4-épimérase²⁾, de la lactate-racémase³⁾, de la β -hydroxybutyryl-CoA-racémase⁷⁾ et de la phosphoribulose-4-épimérase⁴⁾.

¹⁾ TH. POSTERNAK & P. WÄGELL, Helv. 44, 257 (1961).

²⁾ Y. J. TOPPER, J. biol. Chemistry 225, 419 (1957).

³⁾ S. V. RIEDER & I. A. ROSE, J. biol. Chemistry 234, 1007 (1959).

⁴⁾ W. A. WOOD & M. W. McDONOUGH, Federation Proc. 18, 354 (1959).

⁵⁾ H. M. KALCKAR & E. S. MAXWELL, Biochim. biophysica Acta 22, 588 (1956).

⁶⁾ S. KAUFMAN, S. KORKÈS & A. DEL CAMPILLO, J. biol. Chemistry 192, 301 (1951).

⁷⁾ S. J. WAKIL, Biochim. biophysica Acta 18, 314 (1955).