

## 186. Recherches sur la biochimie des cyclitols X. Sur les cyclitol-déshydrogénases d'*Acetobacter suboxydans* I<sup>1</sup>)<sup>2</sup>)

par A. Rapin, A. L. Haenni et Th. Posternak

(4 VIII 67)

*Acetobacter suboxydans*, nommé aussi *Gluconobacter oxydans* [2] ou *Acetomonas oxydans* [3], est un microorganisme très employé en chimie des sucres, en raison de sa propriété de déshydrogéner, avec des rendements parfois satisfaisants, certains polyalcools en cétooses. Ses déshydrogénases avaient donné lieu à des recherches concernant avant tout l'attaque de polyalcools à chaîne ouverte. Le présent travail a trait aux cyclitol-déshydrogénases de ce microorganisme.

### Méthodes expérimentales

*Souches d'Acetobacter suboxydans*. Les souches suivantes ont été employées: 1) *Acetobacter suboxydans* KLUYVER- DE LEEUW; 2) *A. sub.* PL 2435; 3) *A. sub.* PL 2475. Les deux dernières souches nous avaient été données obligeamment par la maison HOFFMANN-LA ROCHE (Bâle); dans ce mémoire, nous les désignons respectivement par HL I et HL II. Toutes les trois souches ont été conservées par repiquage sur le milieu eau de levure-sorbitol 5%. Pour les détails concernant la conservation et les cultures des microorganismes, ainsi que la récolte des cellules, voir nos indications précédentes [4] [5]. Dans certains essais, on a utilisé directement des cellules fraîches, lavées. Dans d'autres cas, les cellules ont été desséchées par lyophilisation et conservées au congélateur à  $-15^{\circ}$ ; dans ces conditions, les ferments oxydants étudiés conservent leur activité durant plusieurs mois.

*Préparation et fractionnement d'extraits acellulaires*. – 1) *Préparation*. Dans de premiers essais, nous avons utilisé pour la désagrégation des parois cellulaires, un vibreur MICKLE en présence de poudre de verre. De meilleurs résultats ont été obtenus par broyage manuel des bactéries fraîches ou lyophilisées, en présence d'alumine ALCOA 301 dans des conditions indiquées par d'autres auteurs [6]. Après une première centrifugation à  $4^{\circ}$ , le culot est encore lavé à l'eau bidistillée. Les extraits totaux, de pH env. 6,4, ont des poids secs d'approximativement 16 mg/ml (souche KLUYVER-DE LEEUW) et de 25 mg/ml (souche HL I) contenant 60–80% de protéines. Ces extraits perdent env. 50% de leur activité enzymatique après 1 mois de séjour à  $-15^{\circ}$ .

2) *Fractionnement des extraits*. L'extrait brut est soumis dans certaines expériences à 12 h de dialyse à  $+4^{\circ}$  contre de l'eau bidistillée. On centrifuge ensuite à 26500 tours/min (60000 g) dans une centrifugeuse SPINCO réfrigérée. On sépare ainsi un précipité gélatineux (désigné par la suite comme «gel») de couleur brune dans le cas des bactéries KLUYVER-DE LEEUW et rose dans celui des bactéries HL I. Entre le surnageant jaune clair fluide (env. 80% du vol. tot. primitif) et le précipité, se trouve un liquide très visqueux (10% du vol. primitif) qui est écarté. Dans la plupart des expériences, le «gel» et le surnageant ont été dilués par l'eau bidistillée au volume primitif de l'extrait de départ, en vue de permettre des comparaisons d'activité. Le surnageant a été fractionné lui-même de la manière suivante: On peut l'appauvrir en une NADH-oxydase particulière, inhibée par  $CN^{-}$ , par 4 h de centrifugation à 145000 g; on utilise ensuite uniquement le tiers supérieur du liquide. Dans certains essais, cette fraction est additionnée de sulfate d'ammonium; on obtient ainsi deux nouvelles fractions précipitant resp. à des saturations de 0,5–0,7 et 0,7–1,0. Dans la première fraction se trouve une NADH-oxydase non inhibée par KCN, qui représente probablement un flavoprotéide [7].

<sup>1</sup>) Cf. thèses de doctorat de A. RAPIN et de A. L. HAENNI [1].

<sup>2</sup>) Abréviations: BM = bleu de méthylène; EDTA = éthylènediamine-tétra-acétate.

*Oxydations.* Les mesures de consommation d'oxygène ont été effectuées au WARBURG à 38° [4]. Pour l'obtention des produits d'oxydation on a opéré:

a) en culture à 32°, en laissant pousser les bactéries sur le milieu contenant le substrat [5]. Dans certains essais, ce milieu contient en outre des tampons 0,1 M de pH 4,5 (acétate), ou 6,0 ou 8,0 (phosphate).

b) au moyen de bactéries au repos, en agitant à 38° dans une atmosphère d'oxygène médicinal (dans une poire à hydrogénation reliée à une burette à gaz) une suspension de bactéries dans la solution convenablement tamponnée du substrat [4].

c) dans le même appareillage qu'en b), en employant des préparations enzymatiques.

*Extrait de bactéries bouillies.* Cet extrait (EBB) a été préparé à partir de cellules broyées à l'alumine dans les conditions indiquées par KING & CHELDELIN [6]: 15 minutes d'ébullition, avec 100 ml H<sub>2</sub>O, du culot provenant de l'extraction de 15 g de bactéries lyophilisées.

*Chromatographies.* On a opéré généralement par chromatographie descendante sur papier WHATMAN 1, en utilisant les systèmes suivants: a) acétone-H<sub>2</sub>O (4:1 en vol.); b) *n*-butanol - ac. acétique glacial - H<sub>2</sub>O (4:1:5 en vol.). Les révélations ont été effectuées généralement au moyen du réactif de TOLLENS [8].

*Produits d'oxydation.* Ils ont été caractérisés par chromatographie sur papier après centrifugation à 12000 g, suivie d'un passage sur une colonne d'Amberlite IR 400 et concentration à basse température. Les hydroxycétones dérivées des cyclohexanediols-1, 2 et du cyclohexanetriol-1, 2, 3 *cis* ont été isolées comme phénylhydrazones. Dans ce but on ajuste, s'il y a lieu, à pH 5 par l'acide acétique, centrifuge 2 h à 60000 g à +4° et concentre dans le vide sulfurique à 4° jusqu'à une concentration de 6% rapportée au substrat primitif. On ajoute ensuite 1 vol. du mélange phénylhydrazine - acide acétique glacial - H<sub>2</sub>O (1:1:1 en vol.). Après un séjour de 2-3 h à +4°, les phénylhydrazones sont essorées, lavées avec un peu d'eau glacée et séchées. Elles sont recristallisées par dissolution dans la quantité minimum de méthanol, suivie éventuellement d'addition d'eau (jusqu'à 1 vol.) et séjour à 4°.

## Résultats

*Mesures d'oxydation par des bactéries au repos de la souche HL I.* Ces études ont été effectuées au WARBURG dans les conditions indiquées autrefois [4]. Le tableau 1 résume les résultats obtenus.

Tableau 1. *Oxydation de cyclitols par A. sub. HL I*

Substrats	Consommation totale en at. O par mol. de substrat	Durée moyenne en min	
		de consommation totale	de demi-consommation
Cyclohexanol	1,0	15	—
Cyclohexanediol-1, 2 <i>cis</i>	1,0	30	—
(±)-Cyclohexanediol-1, 2 <i>trans</i>	1,06	75-80	5-10
(±)-Cyclohexène-1-diol-3, 4 <i>cis</i>	1,0	45-50	—
(±)-Cyclohexène-1-diol-3, 4 <i>trans</i>	1,12	25	5
Cyclopentanediol-1, 2 <i>cis</i>	1,0	10	—
(±)-Cyclopentanediol-1, 2 <i>trans</i>	0,94	85	10-15
Cycloheptanediol-1, 2 <i>cis</i>	1,16	10-15	—
(±)-Cycloheptanediol-1, 2 <i>trans</i>	0,96	35	5-10
Cyclohexanetriol-1, 2, 3/0	1,20	80-110	—
(±)-Cyclohexanetriol-1, 2/3	0,86	>300	120

Les cyclohexanetétrols-2, 3/1, 4, (±)-1, 2, 4/3, (±)-1, 2, 3/4, (±)-1, 2/3, 4, les cyclohexanepentols (-)-1, 2, 4/3, 5 (viburnitol) et (+)-1, 3, 4/2, 5 (quercitol), le *méso*-inositol et le *lévo*-inositol ne sont pas oxydés. Les bactéries HL I oxydent par contre, lentement il est vrai, certains triols et tétrols de la série du cyclopentane; les résultats de ces études seront publiés ultérieurement.

*Méso-inositol-déshydrogénase.* Ce ferment est absent des souches HL I et HL II. Il est contenu dans le «gel» obtenu par centrifugation à haute vitesse des extraits de bactéries ATCC 621 [9] ou

KLUYVER-DE LEEUW; comme nous l'avons confirmé, il est pratiquement absent du liquide surnageant. Dans certaines expériences, nous avons opéré avec l'extrait total non fractionné (mélange du «gel» et du surnageant); dans d'autres cas, le «gel» a été utilisé comme source d'enzyme.

On a constaté, en opérant avec l'extrait brut, que le pH optimum et la vitesse d'oxydation varient avec la nature des tampons. En présence de tris-maléate  $1,7 \cdot 10^{-2} M$  on observe deux pH optima, l'un à 6,3, l'autre à 7,2, les vitesses d'oxydation y étant dans le rapport de 1 à 1,3. A pH 5,7–6,0, l'oxydation en présence de tampons phosphate ou acétate  $1-2,5 \cdot 10^{-2} M$  était env. deux fois moins rapide qu'en présence de tris-maléate. En présence de tris ou de glycolle-NaOH  $1,7 \times 10^{-2} M$ , le pH optimum était de 8,0–8,5 et l'oxydation d'env. 60% fois plus rapide que dans le tampon tris-maléate à pH 7,2.

La vitesse d'oxydation du *ms*-inositol par le ferment particulière («gel») est fortement augmentée par des activateurs en présence des tampons phosphate, acétate, tris-maléate et, à un moindre degré, tris et glycolle-NaOH. Ces activateurs sont présents, mais en quantités insuffisantes, dans le surnageant ainsi que dans l'EBB. Le NAD ou le NADP  $1 \cdot 10^{-4} M$  associés à du BM  $1 \cdot 10^{-3} M$  en présence ou non de FAD  $1 \cdot 10^{-4}$  sont sans effet notable. On observe une inhibition de 85% en présence de NaCN  $1 \cdot 10^{-3} M$  à pH 8,4 (tampon glycolle-NaOH). Soumis à une dialyse contre de l'eau bidistillée, le surnageant (63 h de dialyse) et l'EBB (12 h de dialyse) perdent leurs propriétés activateurs. Il en est de même après agitation avec un volume égal d'une solution à 0,1% de dithionone dans  $CCl_4$ . Ceci rendait probable un effet activant d'ions métalliques. Si les ions  $Zn^{++}$  ou  $Fe^{3+}$   $1 \cdot 10^{-3} M$  ont une action inhibitrice, nous avons constaté par contre une forte activation par les ions  $Mg^{++}$ , la concentration optimum étant comprise entre  $5 \cdot 10^{-3} M$  et  $1 \cdot 10^{-2} M$ . Les fig. 1 et 2 montrent ces activations resp. en présence de «gel» à pH 7,5 (tampon tris-maléate), et à pH 8,5–8,4 (tampon glycolle-NaOH). Les ions  $Ca^{++}$  associés aux ions  $Mg^{++}$  sont sans effet à la conc.  $1 \cdot 10^{-3} M$ ; ils produisent une inhibition de 55–60% à la conc.  $1 \cdot 10^{-2} M$ .

Vu les variations des vitesses d'oxydation avec la nature des tampons, nous avons soupçonné une action inhibitrice de ces derniers. Des essais ont alors été effectués avec une suspension de

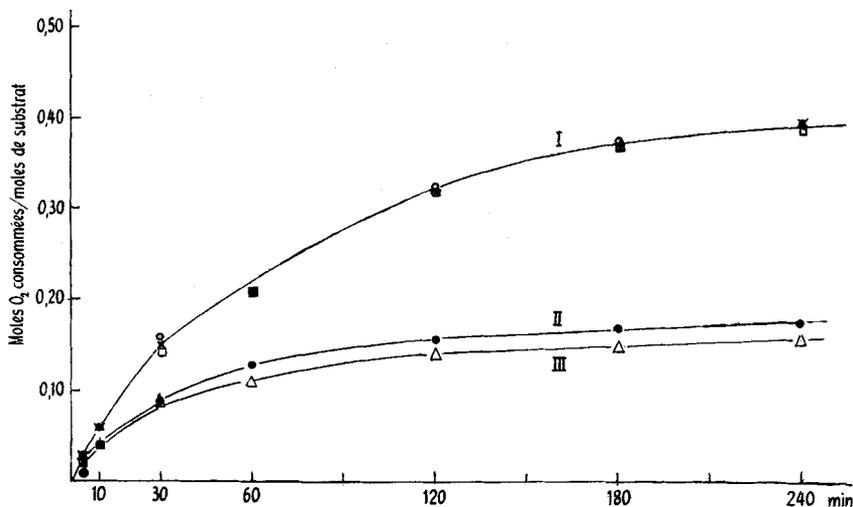


Fig. 1. Effet de  $Mg^{++}$  sur l'oxydation du *ms*-inositol par le «gel»

A part les composants indiqués ci-dessous, chaque récipient de WARBURG contient au début des mesures: 1,25 ml «gel» (pds sec 2,5 mg); tampon tris-maléate  $1,3 \cdot 10^{-2} M$  de pH 7,6; 10  $\mu$ moles de *ms*-inositol. Le vol. total est toujours de 2,9 ml; le puits central contient en outre 0,1 ml KOH 20%.  
 Courbe I: ×  $MgCl_2$   $1 \cdot 10^{-2} M$ ; 0,50 ml EBB dialysé; pH final 7,5. □  $MgCl_2$   $1 \cdot 10^{-2} M$ ; pas d'EBB; pH final 7,5. ○  $MgCl_2$   $5 \cdot 10^{-3} M$ ; 0,50 ml EBB dialysé; pH final 7,5.

Courbe II: ●  $MgCl_2$   $1 \cdot 10^{-3} M$ ; 0,50 ml EBB dialysé; pH final 7,5.

Courbe III: Δ Pas de  $MgCl_2$ ; 0,50 ml EBB dialysé; pH final 7,2.

«gel» dont le pH avait été ajusté à 6,3 ou à 7,5 ou à 8,5 en l'absence de tout tampon. On constate alors que la vitesse d'oxydation est à peu près la même, sinon plus élevée, qu'en présence des

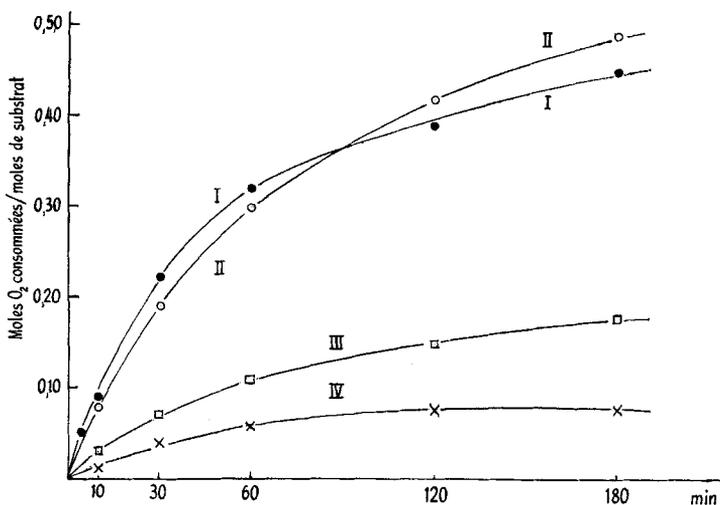


Fig. 2. Effet de  $Mg^{++}$  en présence et en l'absence de tampons

A part les composants indiqués ci-dessous, chaque récipient de WARBURG contient au début des mesures: 1,25 ml «gel» (pds sec 1,5 mg); 10  $\mu$ moles de *ms*-inositol. Le vol. total est toujours de 2,9 ml; le puits central contient en outre 0,1 ml KOH 20%.

Courbe I: «gel seul»; pH initial 8,4; pH final 8,2.

Courbe II:  $MgCl_2$   $1,3 \cdot 10^{-2} M$ ; tampon  $1,3 \cdot 10^{-2} M$  glycolle-NaOH de pH 8,7; pH final 8,4.

Courbe III: tampon  $1,3 \cdot 10^{-2} M$  glycolle-NaOH de pH 8,7; pas de  $MgCl_2$ ; pH final 8,5.

Courbe IV:  $MgCl_2$   $1,3 \cdot 10^{-2} M$ ; pas de tampon; pH initial 8,7; pH final 8,5.

tampons tris-maléate (pH 6,3 et 7,5) et glycolle-NaOH (pH 8,5, fig. 2) additionnés de  $Mg^{++}$ . Il apparaît donc que ce cation, loin d'être un véritable activateur, supprime plutôt les inhibitions dues au tampon utilisé. Ajoutons qu'en l'absence de tampon,  $Mg^{++}$  exerce une action inhibitrice aux pH 7,4 et 8,5 (fig. 2), mais non à pH 6,3.

La nature du produit d'oxydation du *ms*-inositol formé aux différents pH utilisés a été étudiée par chromatographie sur papier, en particulier dans le système acétone-eau (4:1 en vol.), qui permet de séparer les divers inososes connus: nous n'avons pu déceler que la formation de scyllo-*ms*-inosose.

*Déshydrogénase des cyclitols inférieurs.* L'extrait brut des bactéries HL I, dialysé durant 12 h à 4° contre de l'eau bidistillée, a été séparé de la manière indiquée précédemment, en une fraction particulière («gel») et une fraction soluble.

1) *Fraction particulière.* En ce qui concerne l'oxydation des cyclohexanediols-1,2 et du cyclohexanetriol-1,2,3/0, le NAD et le NADP sont sans effet activateur. De même que dans le cas de la *ms*-inositol-déshydrogénase, on observe un effet activateur de l'EBB, qui disparaît presque complètement par dialyse ou sous l'action d'agents complexants (dithizone, EDTA). L'action de l'EBB peut être remplacée en grande partie par celle d'ions  $Mg^{++}$ , accompagnés d'ions  $Ca^{++}$ , aux conditions optimum suivantes:  $MgCl_2$   $1,4 \cdot 10^{-2} M$ ;  $CaCl_2$   $3,5 \cdot 10^{-3} M$ . Dans ces conditions, le pH optimum d'oxydation des trois substrats mentionnés est de 5,1-5,3 (tampon acétate ou phosphate  $3,4 \cdot 10^{-2} M$ ).

2) *Fraction soluble.* La vitesse d'oxydation et le pH optimum dépendent de la nature du tampon; d'autre part, ces enzymes solubles sont activés par le NAD ou le NADP. Comme le montrent les tableaux 2 et 3, l'oxydation du cyclohexanediol-1,2 *cis* et du cyclohexanetriol-1,2,3/0 en présence de tris-maléate de pH 8,2 est plus rapide avec NADP+BM qu'avec NAD+BM. C'est l'inverse qui se produit lors de l'oxydation du ( $\pm$ )-diol *trans*. D'autre part, on observe, suivant la nature du substrat, des variations des pH optimum.

Tableau 2. *Rapports des vitesses initiales d'oxydation*

Tampon tris-maléate  $1,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$  de pH 8,2 en présence: a) de NAD  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  + BM  $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ;  
b) de NADP  $5,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$  + BM  $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Substrats	Rapports des vitesses initiales b)/a)	Substrats	Rapports des vitesses initiales b)/a)
Cyclohexanediol-1, 2 <i>cis</i>	2,0	(±)-Cyclohexanediol-1, 2 <i>trans</i>	0,12
Cyclohexanetriol-1, 2, 3/0	4,0		

Tableau 3. *pH optimum*

Tampon glycolle-NaOH  $1,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; en présence de: a) NAD  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  + BM  $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; b) de NADP  $5,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$  + BM  $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Substrats	Activateurs	pH optimum
Cyclohexanediol-1, 2 <i>cis</i>	NAD + BM	9,2
	NADP + BM	9,9
(±)-Cyclohexanediol-1, 2 <i>trans</i>	NAD + BM	7,9
	NADP + BM	8,15

*Produits d'oxydation.* La nature des produits d'oxydation des cyclohexanediols caractérisés par leurs phénylhydrazones [10] varie avec celle de l'enzyme (tableau 4): on observe la formation d'énantiomères.

Tableau 4. *Produits d'oxydation des cyclohexanediols*

Substrats	Enzymes	Milieu <sup>a)</sup>	Phénylhydrazone <sup>b)</sup> [10]		% C	% H	% N
			[α] <sub>D</sub> (dans l'alcool)	F.			
Cyclohexane- diol-1, 2 <i>cis</i>	particulaire (gel)	1	+ 78,3° ± 3,3°	122–123°	70,76	7,82	13,62
	soluble	2 (NAD)	– 83,4° ± 1,6°	118–120°	–	–	13,25
	soluble	2 (NADP)	– 78,5° ± 2,0°	118–119°	–	–	–
(±)-Cyclohexa- nediol-1, 2 <i>trans</i>	particulaire (gel)	1	– 73,0° ± 2,5°	117–120°	70,71	7,97	13,69
	soluble	2 (NAD)	+ 65,0° ± 2,1°	119–122°	–	–	–
	soluble	2 (NADP)	+ 54,0° ± 2,8°	123–125°	–	–	14,68

a) Milieu 1: 1,25 ml enzyme; tampon acétate  $1,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ;  $\text{MgCl}_2$   $1,4 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; EBB 0,5 ml;  $\text{CaCl}_2$   $0,3 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; substrat  $2 \cdot 10^{-1} \text{M}$ ; vol. total 2,9 ml; pH 5,1.

Milieu 2: 1,25 ml enzyme; tampon tris-maléate  $1,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; NAD  $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$  ou NADP  $5,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ; BM  $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; substrat  $2 \cdot 10^{-1} \text{M}$ ; vol. total 2,9 ml; pH 8,2.

b)  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ON}_2$  Calc. C 70,55 H 7,89 N 13,72%.

*Oxydations par des bactéries intactes.* On a observé des variations, en fonction du pH, de la stéréospécificité d'oxydation par des bactéries KLUYVER-DE LEEUW ou HL I: a) agitées dans une atmosphère d'oxygène, en présence du substrat dissous dans un tampon 0,1M acétate de pH 4,5 ou phosphate de pH 8,0; b) en culture en présence des mêmes tampons (tableau 5).

Après oxydation en culture du cyclohexanetriol-1, 2, 3/0 au moyen de la souche HL 1, on isole une phénylhydrazone identique à celle qui avait été obtenue autrefois au moyen de la souche

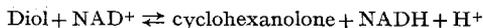
Tableau 5. Oxydation de cyclohexanediols par des bactéries intactes

Substrats	Souches et modes opérateurs	pH	Phénylhydrazones [10]	
			F.	$[\alpha]_D$ (alcool)
(bloc MAQUENNE)				
Cyclohexanediol-1,2 <i>cis</i>	HL I <sup>b)</sup>	4,5	132-134°	+83,9° ± 7,5°
	KDL <sup>a)</sup>	4,5	130-131°	+77,3° ± 5,4°
	KDL <sup>a)</sup>	8,0	133-134°	-80,9° ± 14,6°
(±)-Cyclohexanediol-1,2 <i>trans</i> (demi-oxydation)	HL I <sup>b)</sup>	4,5	126-128°	-84,0° ± 7,7°
	KDL <sup>b)</sup>	4,5	126-128°	-85,5° ± 7,3°
	HL I <sup>a)</sup>	8,0	121-124° <sup>c)</sup>	+63,3° ± 11,1° <sup>c)</sup>
	KDL <sup>a)</sup>	8,0	130°	+58,7° ± 6,9°

KDL = souche KLUYVER-DE LEEUW  
<sup>a)</sup> agitation avec des bactéries «au repos»  
<sup>b)</sup> bactéries en culture  
<sup>c)</sup> C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ON<sub>2</sub> Calc. C 70,55 H 7,89 N 13,72% Tr. C 70,74 H 8,00 N 13,82%

KLUYVER-DE LEEUW [11]: F. 142-143°;  $[\alpha]_D + 56,2^\circ \pm 3,7^\circ$ . Il ne nous a pas été possible d'obtenir cette phénylhydrazone cristallisée après action du «gel» à pH 5,0 ou des ferments solubles à pH 8,2. Par chromatographie sur papier, on constate pourtant dans les deux cas la formation d'une cétone ayant le même Rf que la dihydroxycétone dont dérive la phénylhydrazone mentionnée.

*Constantes enzymatiques.* Les ferments solubles catalysent la réaction suivante:



$$\text{A l'équilibre, on a } K = \frac{[\text{Cyclohexanolone}] [\text{NADH}] [\text{H}^+]}{[\text{Diol}] [\text{NAD}^+]}$$

Utilisant comme préparation enzymatique la fraction partiellement purifiée de HL I précipitée par le sulfate d'ammonium entre 70 et 100% de saturation et dépourvue de quantités notables de NADH-oxydases solubles et particulières, nous avons déterminé à pH 8,0 et environ 20° la constante  $K$  ainsi que les constantes de MICHAELIS  $K_m$ . Les mesures ont été effectuées par voie spectrophotométrique à 340 nm; les  $K_m$  ont été déterminés par la méthode classique de LINEWEAVER & BURKE [12]. En présence de tampon tris-maléate  $8,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  de pH 8,0, de  $\text{MgCl}_2$   $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  et de  $\text{CaCl}_2$   $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , nous trouvons dans le cas du (+)-diol *trans*:  $K = 2,8 \cdot 10^{-11}$ ;  $K_m(\text{NAD}) = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $K_m(\text{diol trans}) = 1,06 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ . Dans les mêmes conditions on observe pour le diol *cis*:  $K = 1,03 \cdot 10^{-12}$ ;  $K_m(\text{diol cis}) = 3,1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ . Pour plus de détails sur ces mesures provisoires, voir HAENNI [1].

### Discussion

*Déshydrogénases des cyclitols supérieurs.* Les enzymes qui déshydrogènent les cyclitols ont donné lieu à relativement peu de travaux. En 1951 FRANZL & CHARGAFF [9], opérant sur *A. sub.* ATCC 621, montraient que les ferments oxydant le méso-inositol se trouvent dans une fraction particulière d'extraits acellulaires. Ils indiquèrent d'autre part qu'un activateur est contenu dans une suspension de bactéries bouillies. L'existence de cet activateur a donné lieu à des indications contradictoires. Si ANDERSON *et al.* [13] confirment les observations mentionnées, ARCUS & EDSON [14] ne constatent aucune oxydation, ni du *ms*-inositol, ni des inositols optiquement actifs, à pH 5,0, par la fraction particulière, même en présence d'EBB ou d'ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ , qui activent l'oxydation du D-mannitol, du D-sorbitol et d'autres polyols acycliques. CHARALAMPOUS & ABRAHAMS [15] indiquent que l'oxydation du *ms*-

inositol par la fraction particulaire ne nécessite aucun activateur. Tous ces auteurs employaient la souche ATCC 621.

Opérant sur la fraction particulaire («gel») de la souche KLUYVER-DE LEEUW, nous constatons une action activante de l'EBB, alors que NAD + BM ou NADP + BM ou FAD sont sans effet. L'action d'EBB peut être remplacée par celle des ions  $Mg^{++}$  à une concentration optimum  $5 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2} M$ . L'association d'ions  $Ca^{++}$  dilués est sans effet; elle produit même une inhibition à la concentration  $1 \cdot 10^{-2} M$  (voir par contre [14]). Comme l'action de l'EBB disparaît presque complètement par dialyse ou par traitement par des agents complexants, elle est due sans doute essentiellement à sa teneur en ions  $Mg^{++}$ . Nous constatons d'autre part que la vitesse d'oxydation dépend de la nature du tampon employé. En milieu acide, les tampons aux phosphates ou aux acétates sont moins favorables que le tris-maléate; en présence de ce dernier, on observe deux pH opt. à 6,3 et 7,2. En milieu plus alcalin, avec le tampon tris ou le tampon glycolle-NaOH, on observe une oxydation plus forte avec un maximum vers 8,0–8,5. L'effet activant de l'EBB ou des ions  $Mg^{++}$  est surtout marqué en milieu acide. En l'absence de tout tampon, on observe, sans aucun activateur, des oxydations par le «gel» tout aussi rapides, et l'addition de  $Mg^{++}$  produit même alors une inhibition à pH 7,4 et 8,4. Il faut en conclure que la déshydrogénase étudiée subit, sous l'action des électrolytes des tampons employés, une inhibition qui, par un mécanisme encore incertain, est supprimée par les ions  $Mg^{++}$ . Ces derniers apparaissent ainsi non pas comme des activateurs, mais comme des dés-inhibiteurs. L'effet favorable des ions  $Mg^{++}$  (+  $Ca^{++}$ ) avait été déjà constaté lors de déshydrogénations de polyols acycliques [14], mais la raison n'en n'avait pas été élucidée.

A en juger par la chromatographie sur papier des produits obtenus à différents pH, le *ms*-inositol ne fournit qu'un seul inosose, le scyllo-*ms*-inosose. On sait que la fraction particulaire qui oxyde le *ms*-inositol, s'attaque aussi à d'autres cyclitols ayant au moins 4 OH voisins (cyclitols supérieurs). Ces oxydations obéissent à une stéréospécificité remarquable et ont comme siège (souche KLUYVER-DE LEEUW) les OH axiaux des formes chaise préférentielles du substrat [4]. On ne peut dire actuellement si ces déshydrogénations de cyclitols supérieurs sont dues à un seul ou à plusieurs ferments.

Les deux autres souches étudiées, HL I et HL II, sont dépourvues de ces déshydrogénases de cyclitols supérieurs.

*Déshydrogénases des cyclitols inférieurs.* Les souches *A. sub.* HL I et HL II sont, comme on vient de le voir, incapables d'oxyder les «cyclitols supérieurs» ayant au moins 4 OH voisins. Elles s'attaquent par contre, à l'instar de la souche KLUYVER-DE LEEUW, à des «cyclitols inférieurs»: cyclanols, cyclanediols-1,2 *cis* et *trans*, cyclohexène-1-diols-3,4 *cis* et *trans*, cyclohexanetriol-1,2,3/0 (tableau 1). L'oxydation du cyclohexanetriol-1,2/3 est par contre beaucoup plus lente qu'avec la souche KLUYVER-DE LEEUW<sup>2)</sup>. L'équipement enzymatique des souches HL I et HL II paraît ainsi plus simple. Pour l'étude des déshydrogénases de cyclitols inférieurs,

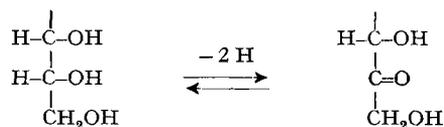
<sup>2)</sup> D'après BARBEZAT *et al.* [15a], ce triol serait oxydé par les déshydrogénases des cyclitols supérieurs de la souche KLUYVER-DE LEEUW qui empièteraient ici sur le domaine des déshydrogénases des cyclitols inférieurs.

nous avons travaillé essentiellement sur la souche HL I. Quelques essais effectués avec la souche KLUYVER-DE LEEUW indiquent que ses déshydrogénases de cyclitols inférieurs sont étroitement apparentées, sinon identiques, à celles de la souche HL I.

La *fraction particulière* de HL I, de pH optimum 5,1–5,3, manifeste des besoins en activateurs analogues à ceux des déshydrogénases des cyclitols supérieurs: EBB, qui peut être remplacé par  $\text{MgCl}_2$   $1,4 \cdot 10^{-2}\text{M}$  +  $\text{CaCl}_2$   $0,3 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ; pas d'effet du NAD ou du NADP. Les *ferments solubles* peuvent être purifiés par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium. Leurs pH optimum sont dans le domaine alcalin; ils ne sont pas activés par les ions  $\text{Mg}^{++}$ , mais nécessitent la présence des coferments NAD ou NADP. Leurs propriétés sont résumées dans les tableaux 2 et 3.

Les différences les plus intéressantes entre les déshydrogénases particulières et solubles des cyclitols inférieurs ont trait à leur stéréospécificité en présence de cyclohexanediols-1,2 (tableau 4). L'enzyme particulière transforme le diol *cis* IV en cyclohexanolone III et s'attaque préférentiellement au (–)-cyclohexanediol-1,2 *trans* (II) en le convertissant en cyclohexanolone V. Dans les deux cas il s'agit de l'attaque d'un groupe –CHOH– de configuration *R*. Par contre, les enzymes solubles ont une stéréospécificité *S*: ils convertissent le diol IV en cyclohexanolone V et, préférentiellement, le (+)-diol I en cyclohexanolone III (l'énantiomère II étant attaqué beaucoup plus lentement). La stéréospécificité des enzymes solubles est indépendante de la nature des coferments (NAD ou NADP)<sup>3</sup>. Nous constatons toutefois qu'en présence du tampon tris-maléate de pH 8,2, le NADP est plus actif que le NAD lors de l'oxydation du cyclohexanediol-1,2 *cis* et du cyclohexanetriol-1,2,3/0 (VII). Bien que les produits d'oxydation n'aient pas été isolés comme phénylhydrazones, il est probable que c'est l'enzyme particulière qui convertit le triol en dihydroxy-2,3-cyclohexanone (VI) [11], alors que le produit d'oxydation par les enzymes solubles serait la dihydroxy-5,6-cyclohexanone (VIII).

Tous les enzymes particuliers mentionnés sont inhibés par NaCN et agissent sans doute par la voie des cytochromes. Dans le cas de ferments analogues attaquant les polyols acycliques, on se représente qu'ils sont fixés à la membrane cytoplasmique [2] et que ce sont eux qui agissent essentiellement dans les cellules intactes, en culture, dont le pH normal est voisin de 5,0, en oxydant ces polyols d'après la règle de BERTRAND-HUDSON. Cette dernière comporte en effet l'attaque d'un carbone de configuration *R*.



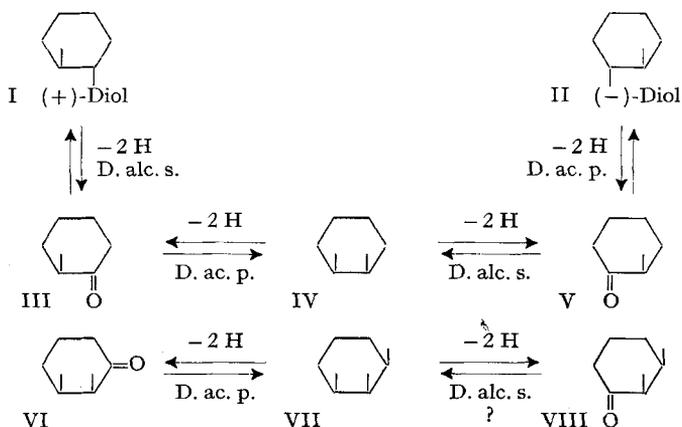
Nous constatons que, lorsque des cellules intactes au repos sont mises en présence de cyclohexanediols à un pH de 8,0, défavorable pour les enzymes particulières de la membrane, le substrat pénètre à l'intérieur des cellules où il est attaqué par les enzymes solubles du cytoplasme, dont le pH est ainsi voisin de celui du milieu. En

<sup>3</sup>) Opérant à pH 8,5 avec un extrait acellulaire brut de la souche ATCC 621, CUMMINS *et al.* [16] avaient montré par contre que la nature des produits d'oxydation du D-sorbitol varie avec celle du coferment: il se forme principalement du D-fructose en présence de NAD, du L-sorbose en présence de NADP. Par chromatographie sur papier, nous avons fait les mêmes constatations avec les ferments solubles de notre souche HL I.

variant le pH de ce dernier, on peut ainsi obtenir l'un ou l'autre des antipodes III et V<sup>4</sup>).

On se figurait primitivement que les polyols acycliques sont oxydés par un seul ferment soluble, peu stéréospécifique, lié à du NAD. Plus récemment, on a pu séparer plusieurs ferments solubles des souches d'*A. sub.* SU [2] et ATCC 621 [17], doués chacun de stéréospécificité étroite en ce qui concerne les polyols acycliques et nécessitant soit du NAD soit du NADP. Il est possible que les oxydations en milieu alcalin des diols et du triol cycliques, soient effectuées chacune par des ferments différents, d'autant plus que les activités des coferments et les pH optimum varient avec la nature du substrat. Une séparation de ces enzymes serait donc à entreprendre.

Notons qu'on a mis en évidence des enzymes de stéréospécificité *R* ou *S* qui s'attaquent à des diols acycliques tels que les butanediols-2,3. Ils diffèrent par divers caractères des ferments, qui viennent d'être décrits, oxydant les diols cycliques. Les enzymes étudiés chez *Bacillus pyomyxa*, *B. subtilis*, *Aerobacter aerogenes* [18] et chez *Neisseria Winogradski* [19] semblent tous agir uniquement à pH 8,0 en présence de NAD. D'autre part, des enzymes solubles précipitant à 20–50% de saturation en sulfate d'ammonium ont été retirés d'*A. sub.* SU [20]; ils ne paraissent oxyder que des monoalcools ou les formes *méso* du butanediol-2,3 et de l'hexanediol-3,4.



D. ac. p. = déshydrogénase «acide» particulière  
 D. alc. s. = déshydrogénase «alcaline» soluble

Ajoutons enfin qu'on a observé encore chez d'autres *Acetobacter* la présence, dans le même organisme, de deux espèces d'enzymes apparentées, l'une particulière agissant en milieu acide, l'autre soluble agissant en milieu alcalin (dans ce dernier cas en présence de NAD ou de NADP): alcool-déshydrogénase [21]; acétaldéhyde-déshydrogénase [22].

Les micro-analyses ont été effectuées par M. le Dr K. EDER, Ecole de Chimie, Université de Genève.

### RÉSUMÉ

1) On a étudié deux souches d'*Acetobacter suboxydans* désignées comme HL I et HL II, qui oxydent en monocétones les cyclohexanediols-1,2 *cis* et *trans* et le cyclohexanetriol-1,2,3/0 (cyclitols inférieurs). Contrairement à la souche d'*A. sub.* KLUYVER-

<sup>4</sup>) Lorsqu'on traite, par contre, à pH 7,5, des cellules au repos de la souche ATCC 621, en présence de D-sorbitol, il se forme essentiellement du L-sorbose et non du D-fructose: le pH interne des cellules resterait peut-être trop bas, dans ces conditions, pour permettre une action notable des ferments solubles [14].

DE LEEUW, elles ne s'attaquent pas aux cyclitols supérieurs contenant au moins 4 OH voisins.

2) La fraction particulière des extraits de bactéries KLUYVER-DE LEEUW contient une ou plusieurs inositol-déshydrogénases agissant probablement par l'intermédiaire des cytochromes. Elles sont activées par les ions  $Mg^{++}$   $0,5-1 \cdot 10^{-2}M$ . Leur pH optimum varie de 6 à 8,5 suivant la nature du tampon. Les ions  $Mg^{++}$  apparaissent comme des désinhibiteurs qui suppriment l'inhibition causée par des composants du tampon. Le scyllo-*ms*-inosose semble être le seul produit d'oxydation formé à partir du *méso*-inositol indépendamment du pH.

3) Les extraits de la souche HL I et de la souche KLUYVER-DE LEEUW contiennent une fraction particulière activée par les ions  $Mg^{++} + Ca^{++}$  qui attaque à pH 5,1-5,3 le cyclohexanediol-1,2 *cis*, le (-)-cyclohexanediol-1,2 *trans* et le cyclohexanetriol-1,2,3/0. Ces substrats sont oxydés avec une stéréospécificité *R*. La fraction soluble des extraits n'est pas activée par les ions mentionnés; elle l'est par le NAD ou le NADP; suivant la nature des substrats et des tampons, le pH optimum est compris entre 8 et 10. L'attaque du diol *cis* et du (+)-diol *trans* se fait avec une stéréospécificité *S*.

L'action des ferments mentionnés s'observe également chez des bactéries intactes. Suivant le pH (4,5 ou 8,0) du milieu, on observe aux dépens, soit du diol *cis*, soit du ( $\pm$ )-diol *trans*, la formation de cyclohexanolones énantiomères.

Genève, Laboratoire de chimie biologique et organique spéciale de l'Université

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. RAPIN, Thèse, Université de Lausanne 1958; A. L. HAENNI, Thèse No. 1336, Université de Genève 1962.
- [2] K. KERSTERS, W. A. WOOD & J. DE LEY, *J. biol. Chemistry* **240**, 965 (1965).
- [3] J. G. CARR & J. L. SHIMWELL, *Leeuwenhoek ned. Tijdschr.* **27**, 386 (1961).
- [4] TH. POSTERNAK & D. REYMOND, *Helv.* **36**, 260 (1953); **38**, 195 (1955); TH. POSTERNAK, A. RAPIN & A. L. HAENNI, *Helv.* **40**, 1594 (1957).
- [5] TH. POSTERNAK & H. FRIEDLI, *Helv.* **36**, 251 (1953).
- [6] T. E. KING & V. H. CHELDELIN, *Biochim. biophysica Acta* **14**, 108 (1954).
- [7] L. P. VERNON & F. G. WHITE, *Biochim. biophysica Acta* **25**, 321 (1957); H. KERSTEN, W. KERSTEN & H. STAUDINGER, *ibid.* **27**, 598 (1958); M. L. DOLIN, *J. Bacteriol.* **77**, 393 (1959).
- [8] TH. POSTERNAK, D. REYMOND & W. HAERDI, *Helv.* **38**, 191 (1955).
- [9] R. FRANZL & E. CHARGAFF, *Nature* **168**, 955 (1951).
- [10] TH. POSTERNAK, D. REYMOND & H. FRIEDLI, *Helv.* **38**, 205 (1955).
- [11] TH. POSTERNAK & F. RAVENNA, *Helv.* **30**, 441 (1947).
- [12] H. LINEWEAVER & D. BURK, *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
- [13] L. ANDERSON, K. TOMITA, P. KUSSI & S. KIRWOOD, *J. biol. Chemistry* **204**, 769 (1953).
- [14] A. C. ARCUS & N. L. EDSON, *Biochem. J.* **64**, 385 (1956).
- [15] F. C. CHARALAMPOUS & P. ABRAHAMS, *J. biol. Chemistry* **225**, 575 (1957).
- [15a] P. BARBEZAT, D. REYMOND & TH. POSTERNAK, *Helv.* **50**, 1811 (1967).
- [16] J. T. CUMMINS, T. E. KING & V. H. CHELDELIN, *J. biol. Chemistry* **224**, 323 (1957); J. T. CUMMINS, V. H. CHELDELIN & T. E. KING, *ibid.* **226**, 301 (1957).
- [17] D. R. D. SHAW & F. L. BYGRAVE, *Biochim. biophysica Acta* **113**, 608 (1966).
- [18] M. B. TAYLOR & E. JUNI, *Biochim. biophysica Acta* **39**, 448 (1960).
- [19] J. P. AUBERT & R. GAVARD, *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 735 (1953).
- [20] K. KERSTERS & J. DE LEY, *Biochim. biophysica Acta* **71**, 311 (1963).
- [21] P. PRIEUR, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **244**, 253 (1957).
- [22] P. PRIEUR, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **250**, 1733 (1960).