

polarimétrique<sup>8)</sup>, mais en général nous avons procédé par la méthode à l'acide hydroxamique selon HESTRIN<sup>24)</sup> pour doser la lactone restante; cette méthode ne permet pas de distinguer les  $\gamma$ - et  $\delta$ -lactones. 0,4 ml du liquide d'hydrolyse + 0,6 ml H<sub>2</sub>O 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 particulière 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- $\delta$ -lactone en D-mannono- $\delta$ -lactone. Cette  $\delta$ -lactono-épimérase de pH optimum 5,1–5,2 est activée par les ions Zn<sup>++</sup> et Mn<sup>++</sup>; 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

<sup>24)</sup> S. HESTRIN, J. biol. Chemistry 180, 250 (1949).

## 32. Sur une $\delta$ -lactono-épimérase II.

### Mécanisme d'action

par Th. Posternak et P. Waegell

(7 XII 60)

Dans la communication précédente<sup>1)</sup> nous avons montré l'existence chez *Acetobacter suboxydans* d'une  $\delta$ -lactono-épimérase qui effectue l'interconversion de la D-mannono- $\delta$ -lactone et de la D-glucono- $\delta$ -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-épimérase<sup>2)</sup>), de la lactate-racémase<sup>3)</sup>, de la  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA-racémase<sup>4)</sup> et de la phosphoribulose-4-épimérase<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> TH. POSTERNAK & P. WÄGELL, Helv. 44, 257 (1961).

<sup>2)</sup> Y. J. TOPPER, J. biol. Chemistry 225, 419 (1957).

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

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

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

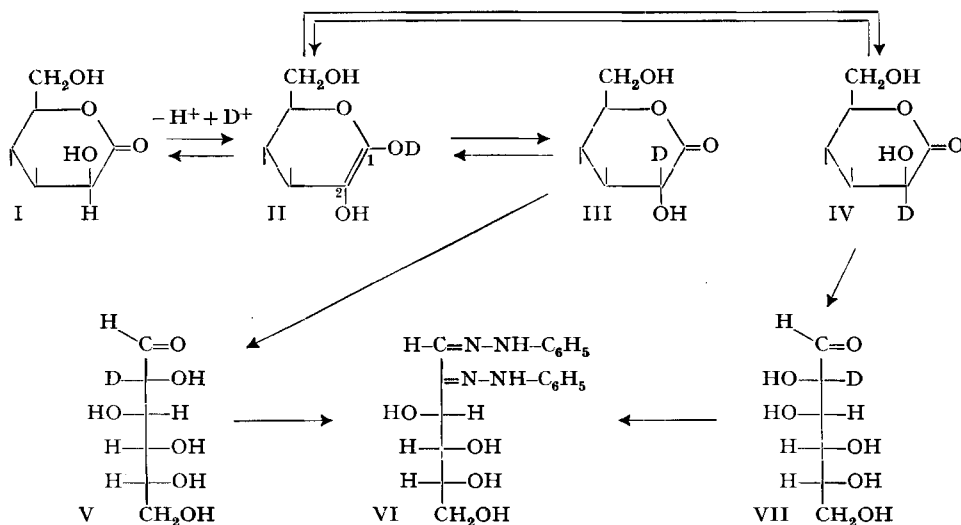
<sup>6)</sup> S. KAUFMAN, S. KORKÈS & A. DEL CAMPILLO, J. biol. Chemistry 192, 301 (1951).

<sup>7)</sup> S. J. WAKIL, Biochim. biophysica Acta 18, 314 (1955).

B) Par une réaction analogue à celle qui avait été rendue probable dans le cas des phosphohexose-, phosphoribose- et phosphotriose-isomérase<sup>2) 3)</sup> et de la phosphoribulose-3-épimérase<sup>4)</sup>, il se formerait intermédiairement un diénol. Ce mécanisme implique un échange, contre l'hydrogène de l'eau, de l'atome d'hydrogène fixé au carbone qui subit l'inversion de configuration.

D'autres mécanismes théoriquement possibles (déshydratation-hydratation, scission-recombinaison aldolique) ont été envisagés. Ils apparaissent comme extrêmement peu probables dans le cas de la  $\delta$ -lactono-épimérase et d'ailleurs on n'a pu jusqu'à présent en montrer l'existence dans le cas d'autres enzymes. Sans préjuger du mode d'action de la lactono-épimérase, on peut faire les remarques suivantes: *Acetobacter suboxydans*, souche KLUYVER & DE LEEUW, peut oxyder le mannonate en acide céto-2-gluconique<sup>8)</sup>; d'autre part, une souche différente de ce microorganisme contient un ferment à base de TPN qui, par une hydrogénation réversible, transforme l'acide céto-2-gluconique en acide gluconique<sup>9)</sup>. Un couplage de ces deux réactions reviendrait ainsi à une épimérisation du type A.

Pour trancher entre les mécanismes A et B, nous avons soumis la D-mannono- $\delta$ -lactone (I) à l'action de l'épimérase dans D<sub>2</sub>O à 78–83%. Il se produit ainsi une incorporation importante de deutérium stable (voir plus loin), ce qui plaide nettement en faveur du mécanisme B (formules I–IV).



L'isotope a été localisé comme suit: le mélange des acides gluconique et mannonique deutériés a été lactonisé, puis réduit par l'amalgame de sodium en milieu acide en un mélange de D-glucose (V) et de D-mannose (VII), qui a été transformé en D-glucosazone (VI). Cette dernière était dépourvue de deutérium, ce qui indique bien que l'isotope se trouvait primitivement en position 2.

Dans les cas d'épimérase et d'isomérase connus jusqu'à présent, le diénol intermédiaire est acylique et on peut se demander si sa configuration est *cis* ou *trans*. Dans

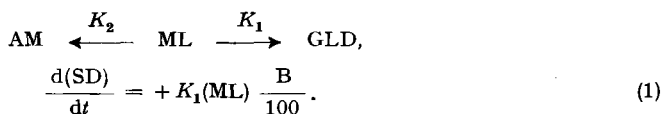
<sup>8)</sup> K. BERNHAUER & H. KNOBLOCH, *Biochem. Z.* 303, 308 (1940).

<sup>9)</sup> J. DE LEY & A. J. STOUTHAMER, *Biophysica Acta* 34, 171 (1959).

notre cas, il faut évidemment attribuer une configuration *cis* au diéno cyclique II. L'attaque en C-2 par les protons se fait soit d'un côté, soit de l'autre du plan contenant C-1, C-2 et les deux OH énoïques, ce qui détermine la nature de l'épimère formé.

En raison de l'hydrolyse spontanée des lactones, l'incorporation observable du deutérium en position 2 doit être inférieure à 1 at. par mol. de substrat. Un calcul approché permet de prévoir l'incorporation maximum possible :

Désignons au temps  $t$  par SD l'ensemble des substances deutériées en C-2 (acides et lactones mannonique et gluconique), par ML la mannonolactone non deutériée, par GLD la gluconolactone deutériée et par AM l'acide mannonique non deutérié;  $(ML_0)$  représente la concentration initiale en mannonolactone et B la teneur en at. % D de l'eau. Nous supposons que l'énoïlisation enzymatique est une réaction du 1er ordre, de constante de vitesse  $K_1$ , ce qui revient à admettre que la constante de MICHAELIS est très élevée. Si cette condition n'est pas réalisée, il se produit une diminution, variant avec  $t$ , de l'expression de  $K_1$  se traduisant par une diminution de l'incorporation : désirant calculer l'incorporation maximum, nous admettons pour cette raison une réaction du premier ordre. Désignons enfin par  $K_2$  la constante de vitesse d'hydrolyse de la mannono- $\delta$ -lactone. Soumettant cette dernière à l'action de l'épimérase en présence d'eau lourde, on a, en négligeant tout effet isotopique :



$$\frac{d(\text{ML})}{dt} = -K_1(\text{ML}) - K_2(\text{ML}). \quad (2)$$

D'après (1) la vitesse d'incorporation totale du deutérium dépend uniquement de la vitesse d'énoïlisation de ML, qui elle-même détermine la vitesse d'épimérisation de ML en GLD; la réaction inverse GLD  $\rightarrow$  MLD n'amène pas de perte de deutérium et les hydrolyses spontanées des lactones ne provoquent ni incorporation, ni perte de deutérium stable. Par intégration, on obtient :

$$(\text{SD}) = \frac{B}{100} (ML_0) \frac{K_1}{K_1 + K_2} (1 - e^{-(K_1 + K_2)t}). \quad (3)$$

$$\text{Si } t = \infty, (\text{SD}) = \frac{B}{100} (ML_0) \frac{K_1}{K_1 + K_2}, \quad (4)$$

L'incorporation  $(\text{SD})/(ML_0)$  ne peut ainsi être supérieure à  $B/100 \cdot K_1/(K_1 + K_2)$ . Ainsi qu'on a pu le montrer dans bien d'autres cas, l'énoïlisation est probablement un processus relativement très lent, dont la vitesse coïncide par conséquent avec celle de l'épimérisation; cette dernière est accessible à la mesure. Nous avons constaté que les vitesses initiales d'épimérisation sont pratiquement les mêmes dans l'eau lourde à 80% et dans l'eau ordinaire. Les expériences principales ont été effectuées dans l'eau à 83 at. % D ( $B = 83$ ). Considérant les vitesses d'épimérisation initiales, nous obtenons par extrapolation graphique à  $t = 0$ ,  $K_1 = 1,57 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Dans la communication précédente<sup>1)</sup>, nous avons indiqué pour  $K_2$  dans  $\text{H}_2\text{O}$   $3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Cette mesure a été répétée dans  $\text{D}_2\text{O}$  à 83%<sup>10)</sup>, les autres conditions restant les mêmes que dans les essais enzymatiques (tampon acétate 0,18 M de pH 5,1; concentration initiale en mannonolactone  $1,04 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ; température 32°): on trouve  $K_2 = 1,95 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Si l'on introduit ces valeurs, on a :

$$\frac{(\text{SD})}{(ML_0)} = \frac{83}{100} \cdot \frac{1,57}{1,57 + 0,195} = 0,738. \quad (5)$$

L'ensemble des produits a été isolé comme mélange de phénylhydrazides gluconique et mannonique contenant 2,91 at. % D en excès. Dans ces dérivés, 1 at. H sur

<sup>10)</sup> Nous avions trouvé<sup>1)</sup> pour la D-glucono- $\delta$ -lactone une constante d'hydrolyse de  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Dans  $\text{D}_2\text{O}$  à 83% (les autres conditions restant les mêmes que précédemment), la constante s'abaisse à  $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

18 est remplaçable par du deutérium, ce qui correspondrait à une teneur de 5,55 at. % D en excès. D'après l'équation (5), on devrait donc trouver dans les phénylhydrazides une teneur maximum de  $0,738 \times 5,55 = 4,10$  at. % D. La teneur observée de 2,91 at. % D en représente 71%. Ce chiffre est analogue à ceux obtenus par TOPPER<sup>2)</sup> et par FREDENHAGEN & BONHOEFFER<sup>11)</sup> dans leurs expériences sur la phosphohexose-isomérase. *Un mécanisme d'épimérisation comportant l'incorporation de 1 at. D par mol. de substrat paraît donc établi.*

Les dosages de D ont été effectués par M. J. NEMETH, Urbana, Ill. Nous remercions vivement M. le Dr CH. HERSCHMANN de la détermination des spectres IR.

### Partie expérimentale

*Vitesse de réaction en présence de D<sub>2</sub>O.* Des essais comparatifs effectués à 32° dans les conditions habituelles (mannono- $\delta$ -lactone 0,167 %; tampon acétate 0,167 M de pH 5,1; ZnCl<sub>2</sub>  $2 \cdot 10^{-4}$  M) en présence de quantités variables de D<sub>2</sub>O, indiquent que les vitesses initiales d'épimérisation restent inchangées; l'eau lourde provoque par contre ultérieurement un ralentissement dû peut-être à une dénaturation plus rapide du ferment.

Temps en min	% de mannonolactone épimérisée			
	0% D <sub>2</sub> O	31% D <sub>2</sub> O	50% D <sub>2</sub> O	78% D <sub>2</sub> O
15	16	17	17	17
30	28	28	28	27
180	53	44	42	39

*Isolement des produits d'épimérisation sous forme de phénylhydrazides.* 200 mg de D-mannono- $\delta$ -lactone sont traités à 32° par l'enzyme dans 120 ml du milieu suivant: D<sub>2</sub>O 78%; tampon acétate 0,183 M de pH 5,1; ZnCl<sub>2</sub>  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Au bout de 10 h l'épimérisation atteint 35%. On maintient 10 min à l'ébullition; après centrifugation, on fait passer sur Dowex-50 (forme H<sup>+</sup>), évapore à sec, reprend par 13,5 ml H<sub>2</sub>O et précipite les impuretés par 50 ml d'alcool comme indiqué précédemment<sup>1)</sup>. Après évaporation à sec, on reprend par 25 ml d'eau et évapore de nouveau à sec; cette opération est répétée 5 fois pour éliminer le deutérium labile. Le mélange des lactones épimères est converti en phénylhydrazides cristallisés. Dans ce but, on reprend par 2,5 ml d'eau et chauffe 5 h au bain-marie après addition de 0,5 ml de phénylhydrazine et de 0,5 ml d'acide acétique à 50%. Après séjour à la glacière, il se sépare au total 237 mg de phénylhydrazides. Après dissolution dans 5 ml d'eau chaude et filtration des impuretés insolubles, on évapore à sec et lave à l'alcool. Le produit est repris par 0,8 ml d'eau bouillante; on ajoute 1,2 ml d'alcool absolu et essore après refroidissement 152 mg de F. 192-194°. Le spectre IR. indique la présence d'un mélange de phénylhydrazides mannonique et gluconique.

*Réduction des lactones en aldoses.* On prépare un mélange de lactones épimères en traitant 250 mg de mannonolactone par le ferment<sup>12)</sup> durant 10 h dans 150 ml d'un milieu de composition suivante: D<sub>2</sub>O 83,0%; tampon acétate 0,18 M de pH 5,1; Zn Cl<sub>2</sub>  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Le mélange des lactones épimères est isolé comme indiqué ci-dessus. 30 mg en sont convertis en phénylhydrazides qui contiennent 2,83; 2,99, soit en moyenne 2,91 at. % D en excès.

Le reste (220 mg) des lactones est soumis au traitement suivant. On dissout dans 25 ml d'eau et traite, en refroidissant par la glace et en agitant mécaniquement, par de l'amalgame de sodium à 2,6% qu'on introduit par petites portions (au total 23 g). Le pH est maintenu entre 2 et 5 par addition en tout de 26 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N; durée totale 50 min. Le liquide est concentré dans le vide à 4,0 ml. On traite 2 h au bain-marie bouillant après addition de 0,52 g de phénylhydrazine, de

<sup>11)</sup> H. FREDENHAGEN & K. F. BONHOEFFER, Z. physikal. Chem. 181, 405 (1938).

<sup>12)</sup> Préparation fractionnée et dialysée contenant 18000 unités.

0,6 ml d'acide acétique glacial et de 0,325 g d'acétate de sodium (tétrahydrate). La glucosazone séparée est lavée successivement à l'eau chaude et à l'alcool; F. et F. de mélange 192–196°; ne contient pas de deutérium.

#### RÉSUMÉ

En présence d'eau deutériée, la  $\delta$ -lactono-épimérase provoque l'incorporation de 1 at. d'isotope stable en position 2 des substrats. La formation intermédiaire d'un diénol est ainsi probable.

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

### 33. Sur la scission hydrolytique des dérivés aldéhydiques du dimédon

par M. Winter et E. Demole

(7 XII 60)

L'emploi du dimédon ou diméthyl-5,5-dihydrorésorcinol (I) pour la précipitation sélective des aldéhydes est classique<sup>1)</sup>. VORLÄNDER, en 1897, fut le premier à préparer ce réactif et à décrire son action sur le formaldéhyde et d'autres aldéhydes<sup>2)</sup> <sup>3)</sup>. Par la suite, le dimédon fut utilisé pour la recherche et l'identification des aldéhydes inférieurs, notamment dans des milieux biologiques.

Les dérivés formés, les alcoylidène-bis-(diméthyl-5,5-dihydrorésorcinsols) (II), proviennent de la condensation d'une molécule d'aldéhyde avec deux molécules de dimédon, réaction effectuée le plus souvent en milieu aqueux ou alcoolique légèrement acide. Les cétones ne réagissent généralement pas dans ces conditions, ce qui permet, par exemple, de précipiter le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde en présence de l'acétone et l'acide glyoxylique en présence de l'acide pyruvique<sup>4)</sup> <sup>5)</sup>. Les cétones peuvent cependant réagir dans des conditions plus énergiques, notamment en milieu acétique à 100°<sup>3)</sup>.

Les rendements de précipitation en milieu aqueux dépendent principalement du type structural des aldéhydes et du pH du milieu réactionnel. Le formaldéhyde donne une réaction particulièrement sensible, permettant un dosage gravimétrique précis<sup>3)</sup> <sup>6)</sup>. Les aldéhydes aliphatiques supérieurs (> C<sub>5</sub>) précipitent relativement lentement alors que le glucose, le lactose, l'arabinose, l'aldéhyde lactique et le chloral ne donnent normalement pas de précipité<sup>5)</sup>. Dans le cas des aldéhydes hydroxylés, l'absence de précipitation n'implique pas nécessairement l'absence de réaction, puisqu'un

<sup>1)</sup> HOUBEN-WEYL, Methoden der organischen Chemie, Vol. 2, Analytische Methoden, p. 450, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953.

<sup>2)</sup> D. VORLÄNDER & J. ERIG, Liebigs Ann. Chem. 294, 314 (1897).

<sup>3)</sup> D. VORLÄNDER & F. KALKOW, Liebigs Ann. Chem. 309, 356 (1899), p. 370 et suiv.

<sup>4)</sup> D. VORLÄNDER, Ber. deutsch. chem. Ges. 58, 2656 (1925).

<sup>5)</sup> D. VORLÄNDER, Angew. Chem. 42, 46 (1929); Z. analyt. Chem. 77, 241 (1929).

<sup>6)</sup> J. H. YOE & L. C. REID, Ind. Engng. Chemistry, Analyt. Edit. 13, 238 (1941); M. V. IONESCU & C. BODEA, Bull. Soc. chim. France [4] 47, 1408 (1930); D. SPENCER & T. HENSHALL, Analyt. chim. Acta 11, 428 (1954).