

Sur les réactions de la peroxydase purifiée par ultrafiltration

Autor(en): **Bach, A.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences physiques et naturelles**

Band (Jahr): **42 (1916)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-743278>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

SUR LES

RÉACTIONS DE LA PEROXYDASE

PURIFIÉE PAR ULTRAFILTRATION

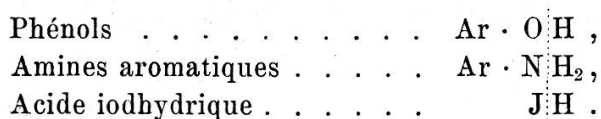
PAR

A. BACH

On sait que le système oxydant peroxydase peroxyde d'hydrogène agit, de même que la phénolase (laccase), sur trois groupes différents de corps chimiques: les phénols, les amines aromatiques et l'acide iodhydrique. Comme les ferments sont censés être spécifiques, c'est-à-dire, susceptibles d'agir sur une seule substance ou, tout au plus, sur un seul groupe de substances, on pouvait supposer que le ferment désigné sous le nom de peroxydase était en réalité constitué par un mélange d'au moins trois ferments spécifiques. Partant de cette idée, j'ai ⁽¹⁾ institué une série d'essais en vue d'isoler les ferments spécifiques de la peroxydase, soit en vue d'en mettre en évidence l'existence individuelle. Mais tous les essais ont donné jusqu'à présent des résultats négatifs. Ni par l'intervention des agents physiques (chauffe fractionnée, précipitation fractionnée par l'alcool), ni par celle des agents chimiques (acides, alcalis, iode, acide cyanhydrique, hydroxylamine, hydrazine) il n'a été possible d'abolir d'une façon durable l'une des fonctions de la peroxydase sans atteindre en même temps les deux autres. Jusqu'à preuve du contraire, nous sommes donc forcés d'admettre que la peroxydase n'est pas un ferment spécifique dans le sens qu'on attribue ordinairement à ce mot. Toutefois, en y regardant de plus près, on constate que les trois groupes de

¹⁾ *Berichte Ch. Ges*, 1907, **40**, pp. 230, 3135.

corps susmentionnés ont cela de commun qu'ils renferment de l'hydrogène mobile dans leur molécule :



On pourrait donc dire que la peroxydase a sa spécificité qui réside dans sa faculté de n'agir que sur l'hydrogène mobile indépendamment de la nature chimique des corps qui le renferment.

Dans un travail antérieur (¹), j'ai montré que, grâce à un ultrafiltre de construction très simple, la peroxydase peut être débarrassée de la presque totalité des cristaalloïdes solubles qui l'accompagnent. Il m'a paru intéressant de rechercher si la peroxydase purifiée par ultrafiltration se comporte vis-à-vis des phénols et des amines aromatiques de la même manière que la peroxydase non-purifiée, en d'autres termes, si l'élimination des cristaalloïdes exerce une influence sur la propriété de la peroxydase d'accélérer l'oxydation de l'hydrogène mobile de ces deux groupes de corps par le peroxyde d'hydrogène.

Pour ces recherches, je me suis servi d'un extrait obtenu en faisant macérer 3 kg. de raifort réduit en pulpe avec 3 litres d'eau pendant 3 jours à la température ordinaire, exprimant et filtrant. Pour éviter l'altération des colloïdes qui se produit toujours lorsqu'on précipite les extraits par l'alcool, je me suis décidé à soumettre directement l'extrait obtenu à l'ultrafiltration, après en avoir réservé une partie pour des essais ultérieurs. Il convient de remarquer que les extraits de peroxydase se conservent pendant des années si l'on a le soin de les bien saturer de toluène. Le passage de 3 litres d'extrait à travers l'ultrafiltre a duré près de 4 mois. Le résidu colloïdal obtenu sur l'ultrafiltre a été lavé avec 1 litre d'eau saturée de toluène et finalement redissous dans 300 cc. cubes d'eau et filtré sur un filtre ordinaire pour séparer les colloïdes qui se sont coagulés spontanément. 1 cc. de cet extrait de peroxydase ultrafiltrée correspondait donc à 10 cc. d'extrait initial. L'extrait ultrafiltré renfermait 1,72 mg. de matière solide par centimètre cube. Avec du pyrogallol et du peroxyde d'hydrogène

¹) *Berichte Ch. Ges.*, 1907, 47.

en excès, il a fourni 89 mg. de purpurogalline par milligramme de ferment sec. Il était parfaitement neutre au tournesol et à la phénolphtaléine. Pour déterminer sa véritable teneur en ions d'hydrogène, j'ai employé la méthode de Bredig basée sur l'hydrolyse de l'éther diazoacétique en azote libre et éther glycolique, hydrolyse qui est en raison directe de la quantité d'ions d'hydrogène en présence dans un liquide. Plusieurs essais ont démontré que la teneur en ions d'hydrogène de l'extrait purifié par ultrafiltration ne dépassait pas sensiblement celle de l'eau employée. L'extrait primitif était franchement acide au tournesol.

10 cc. d'extrait ultrafiltré ont été ramenés à la dilution initiale par l'addition de 90 cc. d'eau et, avec l'extrait ainsi dilué et l'extrait initial non purifié, des expériences d'oxydation comparatives ont été instituées en employant, en présence de peroxyde d'hydrogène, comme substrats les substances suivantes : phénol, gaïacol, hydroquinone, pyrogallol, orcine, aniline, diméthylaniline, diéthylaniline, benzidine et p-phénylènediamine. Il va de soi que les expériences ont été effectuées dans des conditions aussi identiques que possible. Les résultats sont consignés dans le tableau de la page suivante.

On voit que, pour les 4 premiers phénols, il n'y a pas de différence appréciable entre l'extrait initial et l'extrait ultrafiltré. Mais, en ce qui concerne le cinquième phénol, l'orcine, l'extrait ultrafiltré a donné une oxydation normale et l'extrait initial n'en a donné aucune. Par contre, avec les amines aromatiques, c'est l'extrait initial qui a fourni des résultats normaux et l'extrait ultrafiltré qui a donné des résultats négatifs. Cette différence est incontestablement due à la teneur différente des extraits en ions d'hydrogène et au rôle que ceux-ci jouent dans l'oxydation des différents substrats. J'ai déjà mentionné que l'extrait initial rougissait franchement le tournesol, tandis que la teneur en ions d'hydrogène de l'extrait ultrafiltré ne dépassait pas celle de l'eau employée. Or, parmi les substrats, le phénol, le gaïacol, l'hydroquinone et le pyrogallol s'oxydent bien en solution alcaline et neutre, mais ils supportent encore une acidité notable du milieu oxydant. Aussi les deux extraits ont-ils donné les mêmes résultats avec ces phénols. L'orcine s'oxyde en milieu

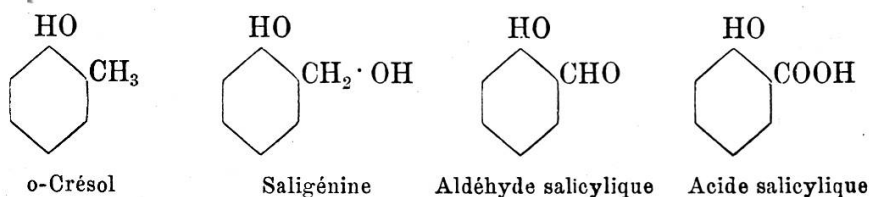
alcalin et neutre, mais reste inaltéré en milieu tant soit peu acide, et c'est pourquoi l'extrait initial a donné un résultat négatif. Par contre, les amines aromatiques ne fournissent leurs produits d'oxydation caractéristiques qu'en milieu acide. L'extrait ultrafiltré, parfaitement neutre, n'a donc pu produire l'oxydation normale de cette catégorie de substrats. Mais après avoir été acidulé par l'acide acétique, il a fourni les mêmes résultats que l'extrait initial.

Substrats	Extrait initial	Extrait ultrafiltré
Phénol.	Rouge-brun, brun foncé, dépôt brun sale.	Rouge-brun, brun foncé, dépôt brun sale.
Gaïacol.	Brun, rouge-brun, dépôt rouge-noir.	Brun, rouge-brun, dépôt rouge-noir.
Hydroquinone.	Rose violacé, rouge, brun, dépôt vert-noir.	Rose violacé, rouge, brun, dépôt vert-noir.
Pyrogallol	Jaune-brun, brun foncé, dépôt rouge orangé.	Jaune-brun, brun foncé, dépôt rouge orangé.
Orcine.	Incolore.	Rose violacé, rouge-brun foncé, dépôt brun.
Aniline.	Violet.	Jaune brunâtre, dépôt.
Diméthylaniline.	Jaune, brun, vert, violet, dépôt violet.	Presque incolore.
Diéthylaniline.	Même succession de couleurs.	Incolore.
Benzidine.	Bleu intense, dépôt bleu.	Brun violacé.
p-phénylènediamine.	Violet intense, brun.	Rouge Bordeaux.

Il résulte de toutes ces expériences que l'état du milieu joue un rôle considérable dans les réactions d'oxydation déclanchées par la peroxydase et qu'on s'expose à des erreurs graves en n'en tenant pas suffisamment compte.

En possession d'une peroxydase purifiée et très active, j'ai cherché à élucider quelques autres questions touchant à l'action de ce ferment et notamment l'influence que la substitution dans le groupe aromatique des phénols exerce sur leur oxydabilité par le système peroxydase + peroxyde d'hydrogène. Des

expériences d'oxydation ont été instituées avec les 4 termes suivants de la série de l'orthocrésol :



Lorsqu'on traite de l'o-crésol et de la saligénine par un mélange de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène, les liquides se colorent en jaune, virent bientôt au brun foncé et au rouge brun et laissent déposer finalement une masse résineuse brun rouge, insoluble dans l'eau, peu solubles dans l'éther, aisément soluble dans l'alcool. Dans les mêmes conditions, l'aldéhyde salicylique n'est point attaquée par le système peroxydase + peroxyde d'hydrogène. Mais si l'on alcalinise légèrement le liquide au moyen de phosphate dipotassique, l'oxydation suit le même cours que dans le cas de l'o-crésol et de la saligénine. On obtient un liquide brun foncé qui, neutralisé par un acide étendu, fournit un précipité brun rouge insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool. Pour ce qui est de l'acide salicylique, il n'est attaqué par le système peroxydase + peroxyde d'hydrogène ni en solution acide, ni en solution neutre, ni en solution alcaline. On voit donc que tant qu'il reste de l'hydrogène lié au carbone dans le groupe substituant, l'oxydation se produit. Quand il y a trois ou deux atomes d'hydrogène au carbone, l'oxydation peut avoir lieu en milieu neutre. Quand il n'en reste qu'un seul (aldéhyde salicylique), les deux autres ayant été remplacés par un atome d'oxygène, il faut un apport d'ions OH ou d'ions équivalents pour mettre en œuvre l'oxydation. Quand le substituant est le groupe carboxyle, il n'y a plus d'oxydation quel que soit le milieu. Des résultats analogues ont été obtenus avec la série para.

Des groupes nitro introduits dans le phénol soit en ortho, soit en para empêchent également toute oxydation par le système peroxydase + peroxyde d'hydrogène.

La signification théorique de ces faits ne saurait encore être discutée utilement pour le moment. J'ajouterai que, dans l'oxy-

dation de l'o-crésol et de la saligénine, j'ai constaté la production d'acide formique caractérisé à l'état de sel d'argent, ce qui prouve que l'oxydation amène la dislocation de la chaîne latérale. Je n'ai pas trouvé de quantités appréciables d'anhydride carbonique. Malheureusement, l'étude de ces réactions n'est pas facile en raison des grandes quantités de peroxydase qu'il faut employer pour obtenir des produits d'oxydation en quantité suffisante pour une étude chimique. Quand on met quatre mois à préparer quelques décigrammes de ferment purifié, on est forcément parcimonieux. Néanmoins, j'ai sacrifié 3 décigrammes de mon ferment le plus pur et le plus actif pour trancher la question de savoir si l'alcool éthylique est oxydé par le système peroxydase + peroxyde d'hydrogène. Les expériences ont été faites en présence de carbonate de chaux pour neutraliser les acides qui pourraient s'être formés au cours de l'oxydation. Comme résultat, je n'ai obtenu ni aldéhyde acétique, ni acide acétique, ni aucun autre acide organique. Et pourtant la quantité d'oxydant mis en œuvre aurait suffi pour oxyder plusieurs grammes de pyrogallol en purpurogalline. Je crois donc pouvoir affirmer que l'alcool éthylique n'est pas attaqué par le système peroxydase + peroxyde d'hydrogène. Dans les êtres vivants, cet alcool est-il oxydé par une oxydase spécifique, une « alcooloxydase » ? Pour ma part, j'en doute fort. Par analogie avec une autre oxydase soit-disant spécifique, la « tyrosineoxydase » qui s'est trouvée être un mélange de deux ferments non-spécifiques, je suis porté à croire que l'alcooloxydase est également un mélange de deux agents dont l'un fait subir à l'alcool une transformation qui le rend susceptible d'être oxydé par l'autre. J'espère pouvoir revenir sur cette question dans un travail ultérieur.
