

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES ENZYMES RESPONSABLES DE L'OXYDATION DES HYDROCARBURES

E. AZOULAY, J. CHOUTEAU ET G. DAVIDOVICS

*Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille
et Laboratoire de Chimie Physiologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)*

(Reçu le 22 avril, 1963)

SUMMARY

Isolation and characterisation of enzymes responsible for the oxidation of hydrocarbons

1. The enzymic system responsible for the transformation of *n*-heptane to heptanol-1 was isolated by fractionated centrifugation from cell-free extracts from bacteria grown on *n*-heptane.

2. This hydrocarbon oxidase system, specific for paraffinic hydrocarbons requires the presence of Fe^{2+} and O_2 . The activity is consistently increased by the addition of NAD.

3. The presence of the reversible hydrocarbon dehydrogenase and olefin reductase activities, specific for NAD in these same systems shows that the oxidation of hydrocarbon to primary alcohol is effected according to two different steps.

INTRODUCTION

Dans le cadre des recherches que nous avons entreprises¹ sur la dégradation bactérienne des hydrocarbures, nous avons signalé que *Pseudomonas aeruginosa* possède des hydrocarbures-deshydrogénases adaptatives utilisant comme accepteur d'hydrogène le NAD. D'autres données expérimentales² nous permettaient par ailleurs de démontrer de façon évidente la formation de hept-1-ène au cours de l'oxydation anaérobie du *n*-heptane par des cellules non proliférantes de *Pseudomonas aeruginosa*. Toutefois si ces faits nous conduisaient à considérer l'étape initiale de l'oxydation de certaines paraffines comme un processus de deshydrogénation, par contre nous avons constaté que les étapes ultérieures du métabolisme et notamment l'oxydation de l'oléfine en alcool étaient des processus aérobie nécessitant la présence d' O_2 libre.

STEWART *et al.*³ dans l'étude de la dégradation de l'hexadécane par des souches de coccus Gram-négatifs avaient pu, en utilisant de l' $^{18}\text{O}_2$ démontrer l'incorporation de cet oxygène dans les molécules de cétyl-palmitate formé au cours de l'oxydation bactérienne de cet hydrocarbure.

Ces auteurs, se référant à des données théoriques avaient émis l'hypothèse selon laquelle la première étape de cette oxydation pourrait être constituée par la formation d'un hydroperoxyde, sans pouvoir toutefois isoler le 1-hexadécyl-hydroperoxyde, ni mettre en évidence la présence d'hydrocarbure: H_2O_2 oxydoréductase (peroxydase) susceptible de réaliser cette étape.

Plus récemment, BAPTIST *et al.*⁴ ont pu constater la formation d'octonoate par des extraits acellulaires de bactéries cultivées sur hexane, sans pour autant définir de façon précise la nature de l'attaque primaire, ni déterminer la structure exacte des composés formés entre l'hydrocarbure saturé et l'alcool primaire.

Pour notre part nous avons isolé et étudié à partir de systèmes enzymatiques provenant de bactéries cultivées sur heptane, une 1-heptanol:NAD oxydoréductase (heptanol-deshydrogénase)⁵ active à l'égard du NAD et une heptaldéhyde:NAD(P) oxydoréductase (heptaldéhyde-deshydrogénase)⁶ active à l'égard du NAD et du NADP.

Le présent travail a été entrepris dans le but d'étudier la première étape de ce métabolisme, ce qui nous a amené à isoler "un système hydrocarbure-oxydase" permettant la transformation de l'hydrocarbure saturé en alcool, et à constater que ce système possède une hydrocarbure:NAD oxydoréductase responsable des activités hydrocarbure-deshydrogénase et oléfine-réductase de ces extraits acellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'organisme employé est une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (Sol 20).

Les bactéries cultivées sur milieu minéral très riche en sels de fer et contenant des hydrocarbures paraffiniques (*n*-heptane) comme seule source de carbone, sont incubées à 32° sous agitation vigoureuse et recueillies selon un procédé déjà décrit⁷. Les extraits enzymatiques sont préparés à partir de suspensions bactériennes dans du tampon phosphate 0.05 M à pH 7.6 par traitement dans une cellule de pression "French pressure-cell".

Préparation des particules

Les extraits acellulaires obtenus dans ces conditions sont soumis à une série de centrifugations dans une Spinco préparative modèle L. Les débris cellulaires sont séparés de la préparation enzymatique par une première centrifugation à $20\,000 \times g$ pendant 15 min. Le surnageant qui constitue "l'extrait brut total", est à nouveau centrifugé à $55\,000 \times g$ pendant 30 min. Les particules remises en suspension dans une solution de KCl 0.1 M contenant des tampons phosphatiques 0.05 M (pH 7.6) constituent "l'extrait particulaire à $55\,000 \times g$ ".

Par ailleurs, cet "extrait brut total" soumis à une centrifugation de 60 min à $144\,000 \times g$ donne un surnageant dénommé "extrait brut à $144\,000 \times g$ " et des particules qui, reprises par une solution de KCl 0.1 M contenant du tampon phosphate 0.05 M (pH 7.6) constituent "l'extrait particulaire à $144\,000 \times g$ ".

Estimation des activités enzymatiques

Ces différents systèmes enzymatiques ont été étudiés à partir de deux méthodes expérimentales.

Détermination spectrophotométrique à 340 mμ: La détermination de l'activité hydrocarbure-deshydrogénase des extraits acellulaires a été établie à partir de la réduction des nicotinamides nucléotides et observée à 340 mμ et à 25° dans des cuves Thunberg Beckman sous atmosphère de N₂ et dans un spectrophotomètre Beckman DU avec des systèmes de 3 ml de composition suivante: "extrait particulaire

à $55\,000 \times g''$ 1 ml (soit environ 3–5 mg d'azote protéique), NAD 7 mM (0.3 ml), suspension de *n*-heptane 0.7 mM (0.5 ml), tampon phosphate 0.05 M (pH 7.1) quantité nécessaire pour avoir 3 ml.

La suspension d'heptane est obtenue par traitement aux ultras-sons d'une solution aqueuse contenant 7 mg d'heptane pur par 100 ml de solution.

L'activité oléfine-réductase a été déterminée dans les mêmes conditions, en remplaçant toutefois le *n*-heptane par du hept-1-ène (50 μ M) et le NAD par une solution de NADH₂ 7 mM (0.3 ml).

Les activités alcool- et aldehyde-deshydrogénases des "extraits bruts à 144 000 $\times g$ et à 55 000 $\times g''$ " ont été étudiées dans des conditions identiques à celles qui ont déjà été définies dans les précédentes publications concernant ces deux enzymes^{5,6}.

Les activités enzymatiques de ces différentes deshydrogénases (et réductase) sont exprimées en μ molécules de NAD (ou NADH₂) réduit (ou oxydé) par min et par mg d'azote protéique.

Analyse par spectrophotométrie dans l'infra-rouge: Les produits formés au cours de l'oxydation des hydrocarbures paraffiniques par les différents extraits enzymatiques ont été identifiés et dosés par utilisation de la spectrophotométrie dans l'infra-rouge selon une technique déjà mise au point dans l'étude de la formation du hept-1-ène à partir du *n*-heptane².

L'étude de la transformation de l'hydrocarbure en alcool ou en acide correspondant a été réalisée à partir de systèmes expérimentaux mis à incuber 1 h à 25° sous agitation vigoureuse et de composition suivante: extrait enzymatique 3 ml, heptane 0.1 ml (soit environ 70 μ molécules), tampon phosphate 0.05 M (pH 7.1) pour un volume final de 9 ml.

Par contre l'étude de la transformation de l'alcool et de l'aldéhyde en acide gras correspondant a été réalisée dans des conditions légèrement différentes, c'est-à-dire à partir de mélanges incubant pendant 15 min sous agitation vigoureuse et contenant: "extrait brut à 144 000 $\times g$ ou à 55 000 $\times g''$ " (3 ml), 1-heptanol (0.2 ml) ou solution d'heptaldehyde 5 mM (3 ml), NAD 7 mM (3 ml), tampon glycine-NaOH 0.05 M (pH 9.5) quantité nécessaire pour avoir 9 ml.

En fin de réaction, les mélanges sont acidifiés par de l'acide sulfurique à 10% et traités par une quantité très faible (3 ml) de CCl₄. Après agitation et refroidissement à 4° les mélanges sont centrifugés à froid et le CCl₄ séparé est analysé par spectrophotométrie dans l'infra-rouge.

Les spectres ont été enregistrés avec un spectrographe infra-rouge Perkin-Elmer modèle-21 à prisme de NaCl, équipé d'un extenseur d'ordonnée. Les spectres des composés de référence, tous liquides, ont été enregistrés en cuves scellées et leurs caractéristiques spectrographiques infra-rouge ont déjà été décrites².

L'analyse quantitative a été réalisée de la manière classique en utilisant les bandes clés des composés à étudier dont nous avons préalablement vérifié qu'elles suivent la loi de Beer et déterminé les coefficients d'extinction (ϵ en M⁻¹·cm⁻¹) dans nos conditions expérimentales.

Les bandes utilisées et les ϵ correspondants sont les suivants.

Acide heptanoïque: bande ν (C=O) du $\text{—C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ associé par liaison hydrogène à 1710 cm⁻¹ (5.85 μ) et $\epsilon = 518.4$. Du fait de la faible concentration d'acide on retrouve à côté de cette bande une autre plus faible ν (C=O) du monomère à 1760 cm⁻¹ (5.68 μ).

Heptaldehyde: bande ν (C=O) du $-\text{C} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \diagup \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ à 1727 cm^{-1} (5.79μ) et $\varepsilon = 138$. L'aldehyde est également caractérisé par la bande ν (C—H) de $-\text{C} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \diagup \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ à 2732 cm^{-1} (3.66μ).

1-Heptanol: bande ν (C—O) de CH_2OH à 1042 cm^{-1} (9.60μ) et $\varepsilon = 63.45$ pour la caractérisation on utilise également la bande $\nu(\text{OH})$ à 3636 cm^{-1} (2.75μ).

Les bandes d'absorption du solvant (CCl_4) ont été compensés à l'aide d'une cuve à épaisseur variable contenant le solvant pur et en choisissant une bande convenable (1064 cm^{-1} (9.40μ) et 1081 cm^{-1} (9.25μ)). En raison des faibles concentrations des produits formés nous avons été amenés à expander les ordonnées 5 et 10 fois, dans ces cas on divise le pourcentage de transmission par le facteur d'expansion avant de transformer cette valeur en densité optique. Les valeurs d'expansion sont indiquées sur les figures par $1 \times$, $5 \times$ et $10 \times$. L'activité enzymatique mesurée dans ces conditions est exprimée en $m\mu$ molécules de produit formé (alcool ou acide) par min et par mg d'azote protéique.

Produits utilisés

Les produits utilisés (hydrocarbures saturés, alcools, aldehydes ou acides gras) sont tous des produits BDH sauf le hept-1-ène qui nous a été aimablement procuré en quantité très faible par la Société des Pétroles BP (Research Department, Sunbury-on-Thames) ces produits ont tous une pureté comprise entre 99.5 et 99.8%, et qu'en aucun cas nous n'avions constaté dans les hydrocarbures utilisés d'impuretés constituées par des produits d'oxydation de ces paraffines.

RÉSULTATS

Oxydation enzymatique des hydrocarbures paraffiniques

(1) Des expériences préliminaires réalisées avec les "extraits bruts totaux" nous permettaient de constater que ces préparations enzymatiques étaient susceptibles de transformer l'hydrocarbure saturé en acide gras correspondant, ce composé étant identifié et dosé par spectrophotométrie infra-rouge (Fig. 1C).

Toutefois dans les conditions précédemment définies 1% seulement de la totalité de l'heptane présent est transformé en acide gras, l'activité enzymatique spécifique étant de l'ordre de 0.83 unités. Par ailleurs l'étude du spectre nous permet de constater qu'il ne s'accumule aucun autre intermédiaire au cours de cette réaction.

Cette transformation n'a pas lieu lorsque le mélange est fortement acidifié par adjonction de H_2SO_4 au 1/10e et que cette addition est faite en même temps que celle de l'heptane. Le spectre infra-rouge du CCl_4 servant à l'extraction des produits réactionnels est identique à celui de l'heptane pur (Fig. 1A).

(2) L'étude et la purification de l'heptanol-deshydrogénase⁵ extraite de préparations provenant de bactéries cultivées sur *n*-heptane, nous avaient amenés à constater qu'il était possible d'obtenir par centrifugation à $144\,000 \times g$ une séparation de l'alcool-deshydrogénase qui se recueillait en grande partie dans le surnageant.

Aussi la transformation enzymatique de l'heptane a-t-elle été étudiée avec des systèmes expérimentaux où "l'extrait brut total" était remplacé par "l'extrait

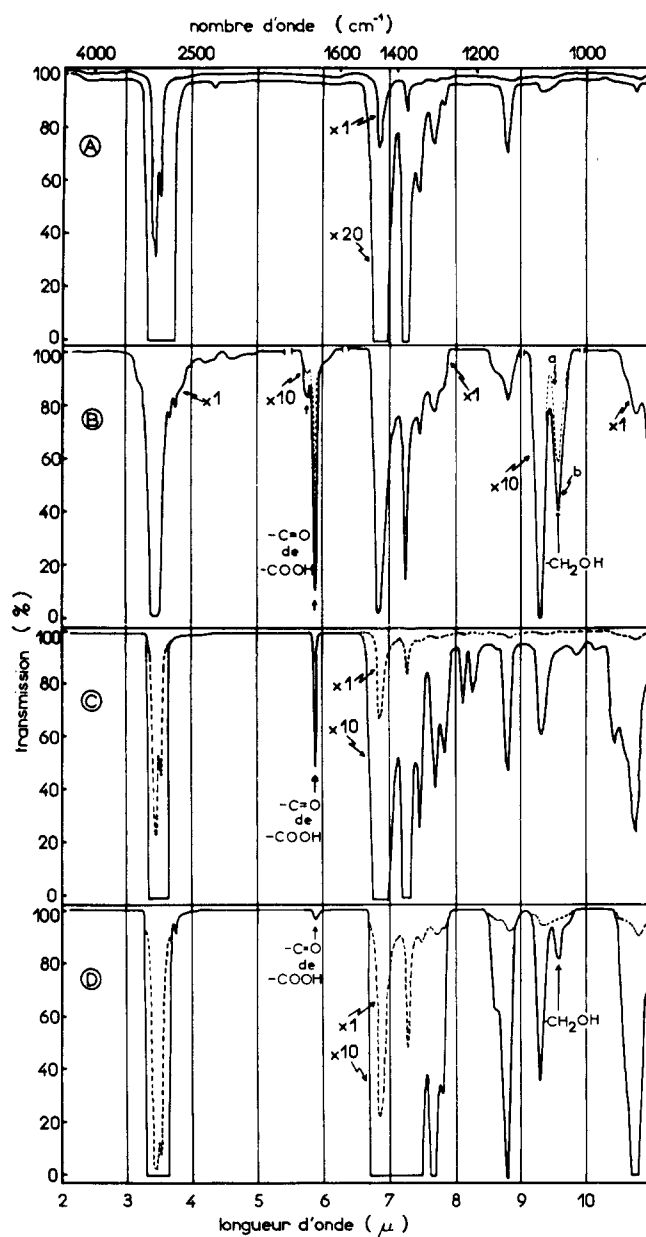


Fig. 1. Activité hydrocarbone-oxydase des extraits acellulaires. Spectres infra-rouge du CCl_4 provenant de systèmes contenant: *n*-heptane ($70 \mu\text{moles}$), tampon phosphate 0.05 M ($\text{pH } 7.1$) pour un volume total de 9 ml . Incubation pendant 1 h sous agitation vigoureuse en présence de: (A), Extrait brut total (3 ml) et de H_2SO_4 10% (2 ml) ajouté en même temps que le substrat. (B), Extrait particulaire à $144\,000 \times g$ (3 ml), (a) sans autre addition, (b) addition de NAD ($21 \mu\text{moles}$). (C), Extrait brut total (3 ml). (D), Extrait particulaire à $55\,000 \times g$.

particulaire à $144\,000 \times g$ ". Et dans ces conditions (Fig. 1B, Courbe a) comme dans les précédentes, l'hydrocarbure est oxydé. Le *n*-heptane est oxydé non seulement en acide gras correspondant, mais encore en alcool primaire, et les quantités de produits intermédiaires formés, sont de l'ordre de 11% pour le 1-heptanol et de 3% pour l'acide heptanoïque.

En considérant l'ensemble des produits formés, l'activité spécifique de cet extrait enzymatique est égale à 20 unités. L'adjonction de NAD à ces systèmes (Fig. 1B, Courbe b) augmente la formation d'alcool primaire de façon notable, et d'acide gras dans des proportions relativement plus faibles. Dans ces conditions, le pourcentage d'activation est de l'ordre de 44%, la quantité de 1-heptanol formé représentant 16% de l'hydrocarbure total et l'acide heptanoïque 4%.

(3) L'analyse des produits formés au cours des précédentes réactions enzymatiques nous incitait à penser que "l'extrait particulaire à $144\,000 \times g$ " contenait la majeure partie des systèmes enzymatiques responsables de la transformation de l'hydrocarbure en alcool. Mais, réalisée dans ces conditions, cette préparation acellulaire possédait encore une certaine fraction des activités alcool- et aldehyde-deshydrogénases susceptibles d'oxyder l'alcool formé au cours de la première étape réactionnelle en acide gras correspondant.

Afin de recueillir uniquement l'activité hydrocarbure-oxydase, nous nous sommes adressés à une nouvelle centrifugation fractionnée.

L'expérience réalisée (Fig. 1D) à partir de "l'extrait particulaire à $55\,000 \times g$ " nous permet de constater que, dans ces conditions, l'hydrocarbure saturé est uniquement transformé en alcool primaire.

La proportion de ce composé formé est de 5% par rapport à la totalité de l'hydrocarbure introduit dans la réaction, l'activité spécifique de ces extraits étant de l'ordre de 4 unités.

Étude des métabolismes intermédiaires

Les résultats obtenus en étudiant l'heptanol- et l'heptaldehyde-deshydrogénase indiquaient que ces activités enzymatiques pouvaient être entièrement récupérées dans les surnageants provenant de centrifugations d'extraits bruts totaux à $55\,000 \times g$ et $144\,000 \times g$.

L'analyse par spectrophotomètre infra-rouge des produits formés au cours des deshydrogénations du 1-heptanol et de l'heptaldehyde par ces systèmes enzymatiques confirmaient ces premiers résultats.

En présence d'un grand excès de 1-heptanol et de NAD (Fig. 2B), une fraction importante de cet alcool est transformé en acide gras correspondant, avec une activité spécifique de l'ordre de 80 unités.

En l'absence de NAD, il n'y a aucune oxydation de cet alcool (Fig. 2A), parallèlement nous avons vérifié que les "extraits surnageants à $144\,000 \times g$ " n'avaient aucune activité endogène, contrairement aux "extraits particuliers".

Une expérience identique réalisée en présence d'extrait brut total à $55\,000 \times g$ avec une quantité définie d'heptaldehyde en remplacement du 1-heptanol donne un échantillon de CCl_4 dont l'analyse quantitative permet de constater qu'en présence de NAD (Fig. 2D) 75–80% de l'heptaldehyde est transformé en acide heptanoïque

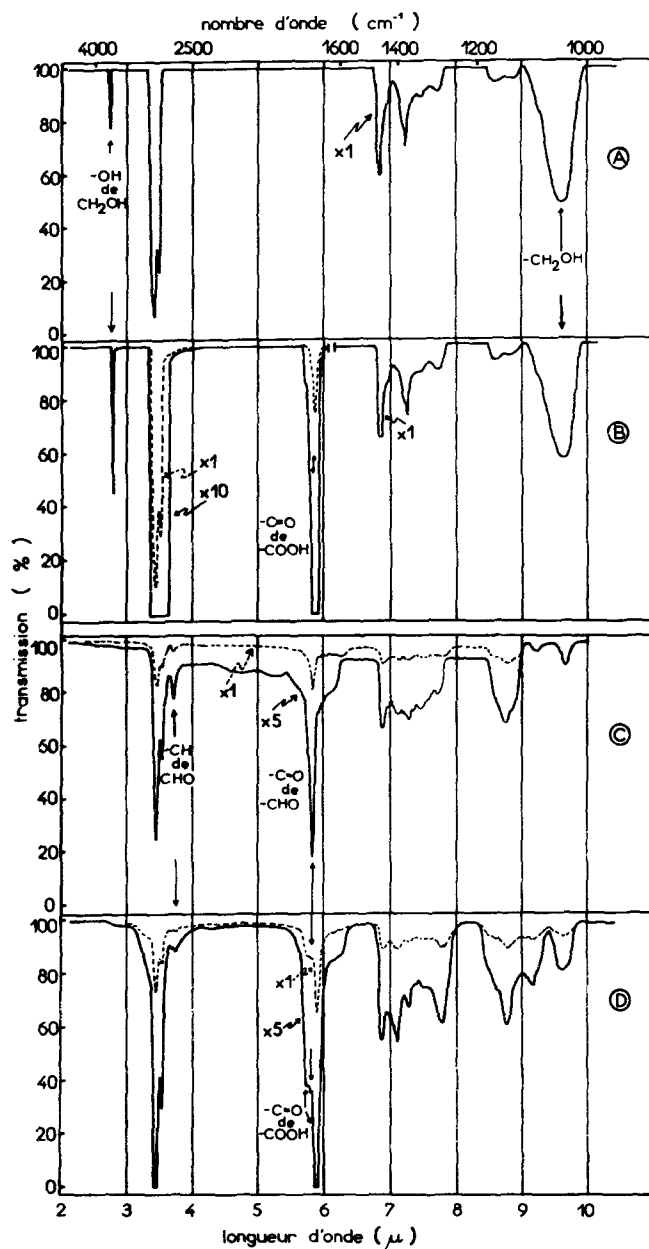


Fig. 2. Activité heptanol- et heptaldéhyde-deshydrogénase des extraits bruts à $144\,000 \times g$ et à $55\,000 \times g$. Spectres infra-rouge du CCl_4 provenant de systèmes contenant: Extrait brut (à $144\,000 \times g$ (A) et (B) et à $55\,000 \times g$ (C) et (D) (3 ml)). Tampon glycine-NaOH 0.05 M (pH 9.5) pour un volume total de 9 ml. Incubation pendant 15 min en présence de: (A), 1-Heptanol (0.2 ml). (B), 1-Heptanol (0.2 ml) et de NAD (21 μmoles). (C), Heptaldéhyde (15 μmoles). (D), Heptaldéhyde (15 μmoles) et de NAD (21 μmoles).

avec une activité enzymatique spécifique de 790 unités, l'absence de NAD ne permettant pas à une telle réaction de se réaliser (Fig. 2C).

L'analyse d'un échantillon de CCl_4 provenant d'un système expérimental contenant en plus de l'heptaldéhyde et du NAD une quantité définie de coenzyme A (0.05 M) et d'ATP (1 mM) permet de retrouver les mêmes quantités d'acide libre que dans le premier échantillon sans aucune trace d'ester, mais dans un temps relativement plus court.

Propriétés de ces systèmes enzymatiques

La séparation par centrifugation fractionnée des systèmes enzymatiques réalisant la transformation du *n*-heptane en 1-heptanol et leurs caractérisations, nous permettaient de déterminer les conditions optima pour lesquelles cette oxydation avait lieu.

Si la centrifugation à $55\,000 \times g$ permet d'isoler uniquement ces systèmes enzymatiques, cette simple opération ne suffit pas à récupérer entièrement cette activité. Toutefois après centrifugation à $144\,000 \times g$ le surnageant obtenu est totalement dépourvu d'activité hydrocarbure-oxydase.

L'activité hydrocarbure-oxydase spécifique des "extraits particuliers" varie entre 4 et 20 unités.

Si l'addition de nicotinamide ne semble nécessaire ni pour réaliser la transformation du *n*-heptane en 1-heptanol, ni même pour activer cette réaction enzymatique, par contre le NAD permet d'obtenir une activation de 44% et en aucun cas le NADP ne peut jouer un tel rôle.

En fonction du pH, l'activité enzymatique présente un optimum pour des pH compris entre 7 et 7.5 en tampon phosphate 0.05 M. Le remplacement des tampons phosphatiques par tout autre tampon entraîne automatiquement une inhibition de 70–85%. Ce système enzymatique est très sensible aux variations de température et sa conservation n'est possible à 0° que pendant 2–3 jours au maximum. De même l'oxydation lui est néfaste, on peut toutefois efficacement le protéger par addition de mercaptoéthanol à très faible concentration ou d'ascorbate.

La transformation du *n*-heptane en 1-heptanol est totalement inhibée par certains agents chélateurs comme l'EDTA, l'*o*-phénantroline ou le 2,2'-dipiridyl; de même la dialyse contre de l'eau additionnée de tampon phosphate 5 mM de pH 7.6 détruit complètement et de façon irréversible les enzymes responsables de cette oxydation.

La présence du fer est indispensable pour obtenir des activités enzymatiques mesurables; en effet, si ces bactéries sont cultivées sur milieu minéral très pauvre en sels de fer, l'activité enzymatique recueillie dans ces conditions est très faible, très difficile à mettre en évidence et à analyser.

En dehors des complexants, l'hydroxylamine à la concentration de 1 mM donne une diminution d'activité hydrocarbure-oxydase de l'ordre de 70%.

Activité hydrocarbure-deshydrogénase des "extraits particuliers"

La possibilité que nous avons de séparer le système enzymatique responsable de la transformation de l'hydrocarbure en alcool primaire exempt totalement d'activité alcool-deshydrogénase et le fait que cette réaction enzymatique fût activée

par addition de NAD, nous incitèrent à vérifier si ces extraits particuliers étaient capables de réaliser la deshydrogénation des hydrocarbures saturés comme nous l'avions déjà constaté dans une précédente publication¹ avec des extraits bruts totaux obtenus dans d'autres conditions.

D'autant plus que ces extraits particuliers, en présence de *n*-heptane consommait l'O₂ en Warburg dans des systèmes expérimentaux identiques à ceux qui ont été précédemment définis, et que cette consommation était notablement activée (134%) par addition de NAD, le NADP n'ayant aucune action.

En présence d'un grand excès de *n*-heptane et sous atmosphère de N₂ la réduction du NAD par les "extraits particuliers à 55 000 × *g*" est tout d'abord linéaire en fonction du temps (Fig. 3, Courbe 2) pour décroître assez rapidement.

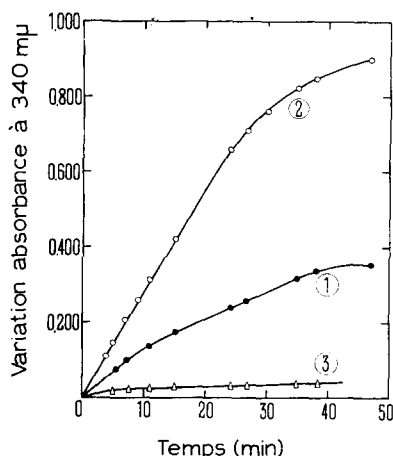


Fig. 3. Activité hydrocarbure-deshydrogénase des extraits particuliers à 55 000 × *g*. Réduction du NAD dans des systèmes contenant NAD 7 mM (0.3 ml), extrait particulière à 55 000 × *g* (3 mg azote protéique), tampon phosphates 0.05 M (pH 7.1) quantité nécessaire pour avoir 3 ml. (1) ●—●, sans aucun autre produit. (2) ○—○, addition de *n*-heptane 0.7 mM (0.5 ml). (3) △—△, addition de hept-1-ène 0.5 mM (0.3 ml).

Si dans les mêmes conditions expérimentales, le FAD oxydé peut remplacer dans une faible mesure le NAD, les autres flavines et le NADP ne peuvent en aucun cas remplacer efficacement ce coenzyme.

Ces extraits particuliers sont incapables de réduire le NAD ou tout autre accepteur d'électrons en présence de hept-1-ène (Fig. 3, Courbe 3). Toutefois, ils possèdent une assez forte activité endogène (Fig. 3, Courbe 1) difficile à éliminer, sans dénaturer totalement l'enzyme.

L'activité spécifique "hydrocarbure-deshydrogénase" de l'hydrocarbure:NAD oxydoréductase de ces préparations enzymatiques, calculée après déduction de l'activité endogène, varie entre 5 et 20 unités. En présence de FAD comme accepteur d'hydrogène cette activité spécifique ne représente plus que le quart de la valeur obtenue en présence de NAD.

La vitesse de réduction du NAD est proportionnelle à la quantité d'extrait, elle est nulle après chauffage des préparations enzymatiques à 100°. L'influence de la

concentration en substrat sur l'activité est difficile à déterminer de façon précise par suite de l'impossibilité de connaître exactement les concentrations de l'hydrocarbure dans les systèmes réactionnels.

En fonction de la nature du substrat, cette activité est spécifique des hydrocarbures saturés à chaîne droite. Toutefois l'activité obtenue avec le *n*-heptane est supérieure de 12% à celle qui est déterminée en présence de *n*-octane. Cette activité est totalement inhibée par addition d'EDTA à la concentration de 0.1 mM, et elle est augmentée par incubation des extraits enzymatiques en présence de sels de fer. Cet enzyme est très labile, et cette fragilité se traduit par le fait que les essais de purification par précipitation avec le sulfate d'ammonium ont donné des résultats négatifs et ont constamment entraîné la perte totale de l'activité deshydrogénasique.

Influence de l'O₂ sur l'activité hydrocarbure-deshydrogénase

Les essais de réduction du NAD en présence de *n*-heptane par des "extraits particuliers à 55 000 × g" sous atmosphère d'O₂ (Fig. 4, Courbe 3) et après agitation

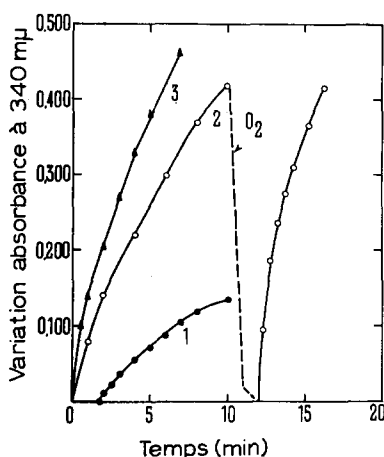


Fig. 4. Réduction du NAD dans des systèmes contenant: extrait particulaire à 55 000 × g (5 mg azote protéique), NAD 7 mM (0.3 ml), tampon phosphate 0.05 M (pH 7.1) quantité nécessaire pour avoir 3 ml. (1) ●—●, sans aucun autre produit, étude sous atmosphère de N₂. (2) ○—○, addition de *n*-heptane 0.7 mM (0.5 ml) début de la réaction sous atmosphère de N₂ puis introduction d'O₂. (3), ▲—▲, addition de *n*-heptane 0.7 mM (0.5 ml) étude en présence d'O₂ après incubation en présence d'air.

vigoureuse, permettaient de constater que la réduction du NAD était linéaire en fonction du temps et que l'activité enzymatique calculée dans ces conditions était supérieure à celle qui a été précédemment déterminée.

De même pour un système réactionnel étudié sous atmosphère de N₂ (Fig. 4, Courbe 2) le simple fait d'introduire l'O₂ suffit pour réactiver ce système enzymatique, malgré la présence dans des "extraits particuliers à 55 000 × g" d'une très forte activité: NADH₂ oxydase.

L'activité "hydrocarbure-deshydrogénase" spécifique calculée dans ces conditions est de l'ordre de 12-35 unités soit deux fois plus grande que celle qui a été calculée sous atmosphère de N_2 .

Activité oléfine-réductase de l'hydrocarbure: NAD oxydoréductase

L'allure rapidement décroissante de la courbe de deshydrogénation des hydrocarbures saturés sous N_2 , et l'influence de l' O_2 sur cette réaction enzymatique, nous amenèrent à penser que sous atmosphère de N_2 la réaction inverse de la deshydrogénation des hydrocarbures saturés avait une activité enzymatique assez importante dès que la concentration en $NADH_2$ augmentait.

En présence de hept-1-ène les "extraits particuliers à $55\ 000 \times g$ " oxydent le $NADH_2$ (Fig. 5, Courbe 2) sous N_2 , c'est-à-dire en l'absence de $NADH_2$ oxydase (Fig. 5, Courbe 1).

Cette oxydation est linéaire en fonction du temps et ne diminue que lorsque la concentration du $NADH_2$ devient plus faible.

L'activité spécifique calculée dans ces conditions est de l'ordre de 50 unités. Elle est optimum pour des pH compris entre 6.8 et 7.3.

L'étude des propriétés de l'oléfine-réductase indique que cette activité est de nature enzymatique, et que l'enzyme responsable de cette réduction est bien l'hydrocarbure-deshydrogénase:NAD oxydoréductase.

DISCUSSION

L'adaptation de la méthode d'analyse spectrophotométrique dans l'infra-rouge à l'étude de ce métabolisme permet d'identifier de façon certaine les intermédiaires formés au cours des différentes étapes enzymatiques et de les doser en même temps avec précision.

L'utilisation de l'expansion d'ordonnée permet d'appliquer cette méthode,

TABLEAU I
ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DES EXTRACTS ACELLULAIRES PROVENANT
DE BACTÉRIES CULTIVÉES SUR *n*-HEPTANE

Enzyme responsable	Nature de l'activité enzymatique	Valeur spécifique (unités)*	
		Détermination par spectro- photométrie infra-rouge	Détermination par spectro- photométrie dans l'ultra-violet (NAD)
Système particulaire	Hydrocarbure-oxydase	4-20	—
Hydrocarbure:NAD oxydoréductase	Hydrocarbure-deshydrogénase	—	5-20
	Oléfine-réductase	—	50
1-Heptanol:NAD oxydoréductase	Heptanol-deshydrogénase	80	70-90
	Heptaldehyde-réductase	—	7
Heptaldehyde:NAD(P) oxydo- réductase	Heptaldehyde-deshydrogénase	790	650-900

*La définition des unités est donnée dans le texte.

comme nous l'avions déjà décrite² à des concentrations très faibles, qu'il serait très difficile, sinon impossible, d'étudier par d'autres méthodes analytiques (Tableau I).

De plus cette méthode pouvant identifier et doser en même temps plusieurs intermédiaires permet de saisir la totalité des étapes sans qu'il soit nécessaire de faire appel à des fractionnements préalables avant toute analyse.

Les données expérimentales qui viennent d'être rapportées démontrent de façon évidente que les extraits particuliers obtenus par centrifugation à $55\,000 \times g$ contiennent la totalité des enzymes permettant de transformer le *n*-heptane en 1-heptanol.

Cette activité enzymatique peu stable et très sensible aux agents d'oxydation et aux complexants requiert la présence de Fe^{2+} et d' O_2 .

Cette transformation ne nécessite aucun coenzyme particulier, toutefois l'addition de NAD augmente de façon notable la quantité d'alcool formée.

L'étude de l'influence du NAD nous a permis, par ailleurs, de constater que ces mêmes extraits particuliers, exempts d'activité alcool-deshydrogénase, étaient susceptibles de réaliser la deshydrogénation enzymatique des hydrocarbures saturés et la réaction inverse.

Cette deshydrogénation enzymatique du *n*-heptane en présence de NAD est deux fois plus faible sous atmosphère de N_2 qu'en présence d' O_2 . Aussi, est-il probable que sous N_2 la cinétique de deshydrogénation du *n*-heptane est en réalité la résultante des deux réactions directe et inverse. Or comme l'activité oléfine-réductase devient plus forte que l'activité hydrocarbure-deshydrogénase, pour un même pH, en présence de quantités croissantes de NADH_2 , la courbe de deshydrogénation du *n*-heptane (Fig. 3, Courbe 2) s'atténue rapidement en fonction du temps pour s'annuler totalement, bien que le système contienne encore suffisamment d'accepteur d'hydrogène et de substrat.

C'est une des raisons pour lesquelles il nous a été impossible de mettre en évidence

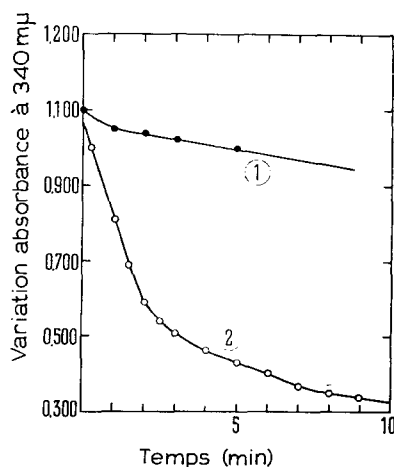


Fig. 5. Activité oléfine-réductase des extraits particuliers à $55\,000 \times g$. Oxydation du NADH_2 dans des systèmes contenant: extrait particulière à $55\,000 \times g$ (5 mg azote protéique), NADH_2 7 mM (0.3 ml), tampon phosphate 0.05 M (pH 7.1) quantité nécessaire pour avoir 3 ml, sous atmosphère de N_2 . (1) ●—●, sans aucun autre produit. (2) ○—○, addition de hept-1-ène (50 μ moles).

la formation de hept-1-ène à partir de *n*-heptane en présence d'extraits acellulaires sous vide.

Le simple fait d'introduire l'O₂ dans les systèmes réactionnels de deshydrogénation des hydrocarbures, déclenche la réaction suivante qui est une réaction de fixation d'O₂ libre sur la molécule d'oléfine et permet ainsi d'éliminer dès leur formation les quantités de hept-1-ène résultantes de la deshydrogénation du *n*-heptane.

Ainsi la présence d'une activité hydrocarbure-deshydrogénase dans les extraits acellulaires responsables de la transformation de l'hydrocarbure saturé en alcool primaire, indique que cette transformation s'effectue suivant deux étapes catalysées chacune par un enzyme différent.

La première étape sous la dépendance de l'hydrocarbure-deshydrogénase permettrait le passage de l'hydrocarbure saturé à l'insaturé. Dans un deuxième stade l'oléfine serait oxydée en alcool primaire par l'intermédiaire d'un ou plusieurs enzymes actifs en présence d'O₂ libre.

Nos résultats expérimentaux démontrent ainsi que, l'attaque initiale du *n*-heptane et des paraffines homologues est différente de celle qui a été proposée par STEWART *et al.*³ dans son schéma de dégradation de l'octadécane par des cocci Gram-négatifs, hypothèse reprise par BAPTIST *et al.* dans l'étude de l'oxydation de l'octane par des extraits bactériens⁴.

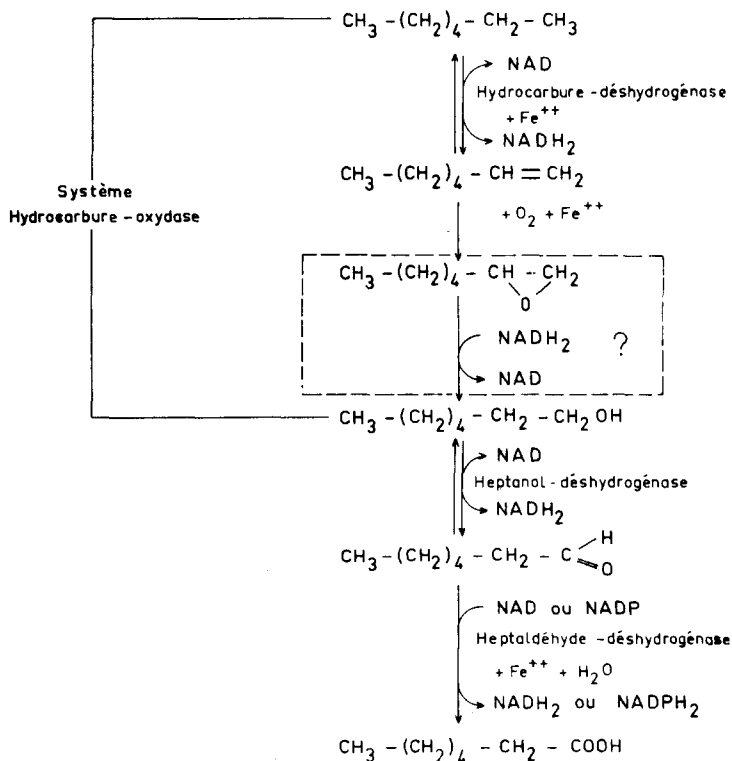


Fig. 6. Schéma des différentes séquences enzymatiques relatives à la transformation du *n*-heptane en acide heptanoïque par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (Sol 20).

En ce qui concerne l'oxydation enzymatique de l'oléfine formée au cours de la première étape, il est possible de penser à la formation intermédiaire d'un époxyde sous l'action d'un complexe enzymatique ferro-protéine et oxygène de nature $E-Fe^{2+}-O$ selon la théorie de MITOMA *et al.*⁸ rapportée par MASON⁹. Cet époxyde, en présence de $NADH_2$ pourrait donner naissance à un alcool primaire et non à un alcool secondaire ou un diol comme l'avait constaté BRUYN¹⁰ pour *Candida lipolytica*. D'ailleurs DAVIDOW ET RADOMSKI¹¹ avaient proposé l'époxyde comme intermédiaire dans la formation enzymatique du phénol à partir de composés insaturés.

Les résultats expérimentaux précédemment décrits ont été retrouvés avec des extraits enzymatiques provenant de bactéries autre que *Pseudomonas aeruginosa* en particulier avec une souche (Sol 19) de *Pseudomonas desmolyticum*. Toutefois il est possible que l'étape primaire de l'oxydation des paraffines s'opère par des voies différentes suivant l'organisme considéré et suivant la nature de l'hydrocarbure.

Dans notre cas, tout au moins, en nous basant sur les hypothèses émises et en se référant aux résultats expérimentaux découverts tant en ce qui concerne le stade initial de l'oxydation du *n*-heptane que les étapes suivantes^{5,6}, nous avons été conduits à proposer, pour la dégradation bactérienne des paraffines aliphatiques à faible poids moléculaire, le schéma décrit dans la Fig. 6.

L'impossibilité où nous étions d'obtenir des hydrocarbures insaturés très purs (exempts de produits d'oxydation) en quantité suffisante, ne nous a pas permis d'isoler et d'étudier le système oléfine-oxydase.

RÉSUMÉ

1. Le système enzymatique responsable de la transformation du *n*-heptane en 1-heptanol a été isolé par centrifugation fractionnée à partir d'extraits acellulaires de bactéries cultivées sur *n*-heptane.

2. Ce système hydrocarbure-oxydase, spécifique des paraffines aliphatiques à chaîne droite et à nombre d'atomes de carbone plus petit que dix, requiert la présence de Fe^{2+} et d' O_2 . Il est par ailleurs notablement activé par addition de NAD.

3. La présence d'activités hydrocarbure-deshydrogénase et oléfine-réductase spécifiques du NAD dans ces mêmes systèmes indique que l'oxydation de l'hydrocarbure en alcool primaire s'effectue suivant deux étapes différentes.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. C. SENEZ ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 307.
- ² J. CHOUTEAU, E. AZOULAY ET J. C. SENEZ, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 671.
- ³ J. E. STEWART, R. E. KALLIO, D. P. STEVENSON, A. C. JONES ET D. O. SCHISSLER, *J. Bacteriol.*, 78 (1959) 441.
- ⁴ J. N. BAPTIST, R. K. GHOLSON ET M. J. COON, *Biochem. Biophys. Acta*, 69 (1963) 40.
- ⁵ E. AZOULAY ET M. T. HEYDEMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 73 (1963) 1.
- ⁶ M. T. HEYDEMAN ET E. AZOULAY, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 545.
- ⁷ E. AZOULAY ET J. C. SENEZ, *Ann. Inst. Pasteur*, 98 (1960) 868.
- ⁸ C. MITOMA, H. S. POSNER, H. C. REITZ ET S. UDENFRIEND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 61 (1956) 431.
- ⁹ H. S. MASON, *Advan. Enzymol.*, 19 (1957) 79.
- ¹⁰ J. BRUYN, *Koninkl. Ned. Acad. Wetenschap. Proc. Ser. C*, 57 (1954) 41.
- ¹¹ B. DAVIDOW ET J. L. RADOMSKI, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 107 (1953) 259.