

## MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

### NOUVELLES RECHERCHES SUR L'ENZYME DE SCHARDINGER

par

L. M. BURUIANA

DUCLAUX (1894) a remarqué pour la première fois que le lait infecté par les bactéries lactiques est capable de décolorer le bleu de méthylène.

SCHARDINGER (1902) a observé le même phénomène avec le lait fraîchement trait, si l'on ajoute de l'aldéhyde formique. SCHARDINGER attribua cette décoloration à l'exaltation de l'activité bactérienne par l'aldéhyde.

C'est TRÖMMSDORFF (1909) qui attribua la décoloration du bleu de méthylène en présence de l'aldéhyde à une enzyme.

Cette enzyme toutefois a été appelée l'enzyme de Schardinger. Depuis l'observation de SCHARDINGER, un nombre impressionnant de chercheurs ont étudié ce phénomène connu sous le nom de *réaction de Schardinger*, soit pour l'expliquer, soit pour l'utiliser au contrôle hygiénique du lait. Les résultats ont été maintes fois controversés. Nous résumerons les nombreuses observations qui présentent un intérêt particulier.

**La présence et la fréquence de l'enzyme.** A. HARDEN et L. CLAYPON (1912), ne trouvent pas cette enzyme dans le lait de chèvre. Le fait a été contesté par JANOSCHEK (1929). Des recherches récentes entreprises par nous ont confirmé la constatation de HARDEN et CLAYPON. En dosant par une technique nouvelle très sensible qui utilise, comme accepteur d'hydrogène, les nitrates, ou par potentiométrie, j'ai trouvé que le lait de chèvre contient une quantité extrêmement faible d'enzyme qui ne peut être mise en évidence par la réduction du bleu de méthylène ou peut même complètement manquer.

V. GAETANO (1926) ne trouve pas l'enzyme dans le lait de brebis et propose même une technique basée sur ce fait pour la différenciation du lait de brebis du lait de vache.

SCHMIDT (1906), WEDEMANN (1914) et WILDT (1925) ne trouvent pas cette enzyme dans le lait de femme et F. Lee RODKEY et Eric G. BALL [1] récemment ont établi une méthode de différenciation du lait de femme falsifié avec du lait de vache.

Des dosages encore à compléter avec la technique déjà indiquée

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

nous ont prouvé que le lait de femme contient l'enzyme de Schardinger, mais le taux est de 50-100 fois plus petit que dans le lait de vache.

Il paraît que le lait de truie, jument et ânesse ne contient pas cette enzyme.

L. M. BURUANA (1935) a montré que le lait de bufflesse est de loin le plus riche en enzyme de Schardinger (2-10 fois plus que celui de vache).

En ce qui concerne la variation de la quantité avec la période de lactation, REINHARDO et SEIBOLDT (1911) ont constaté que l'enzyme est diminuée ou peut même manquer dans le colostrum et HOUDINIÈRE (1933) observe que le lait de fin de lactation contient très peu d'enzyme.

#### **L'utilisation de l'enzyme pour le contrôle hygiénique.** —

Dans presque tous les traités de Lactologie, on indique, assez vaguement d'ailleurs, que la recherche de cette enzyme peut fournir des indications quant au traitement thermique du lait. Dans le « *Traité* » de A. ROCHAIX et A. TAPERNOUX (1942) on trouve la suggestion que cette réaction semble la meilleure pour déterminer si une crème a été « chauffée ou non ». Nous devons tout récemment à J. PIEN [2] une étude très complète sur l'utilisation de cette réaction pour le contrôle de la pasteurisation du lait et de la crème.

Certains auteurs ont préconisé l'utilité de la réaction de Schardinger pour le contrôle des laits de mammites. C. I. KONING (1906) a prétendu que l'enzyme de Schardinger augmente dans les mammites. Nos recherches récentes ont démontré le contraire.

#### **L'état physique de l'enzyme dans le lait.** SELIGMANN (1906) remarque que la crème contient plus d'enzyme que le lait et fait l'hypothèse que l'enzyme doit être absorbée ou adsorbée par la membrane aptogène des globules gras. Le fait a été vérifié aussi par C. I. KONING (1906), ORLA-JENSEN (1906), P. H. ROMER et JAMES (1910), Z. BARTHEL (1917), H. WIELAND et B. ROSENFELD (1929), G. SCHWARZ (1928), etc.

MONVOISIN est de l'opinion que l'enzyme est uniformément distribuée dans toute la masse du lait.

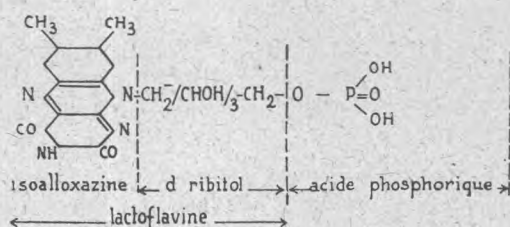
C'est un fait bien établi aujourd'hui que l'enzyme de Schardinger est adsorbée par les globules gras, fait couramment utilisé pour la séparation de l'enzyme du lait.

Nous avons constaté que le froid, l'agitation, le *pH* et probablement d'autres facteurs accélèrent fortement le passage de l'enzyme dans la masse du lait (1935).

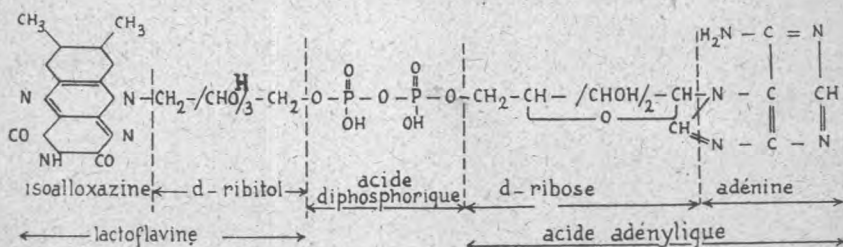
#### **La composition chimique de l'enzyme de Schardinger.**

L'enzyme de Schardinger fait partie de la catégorie des flavopro-

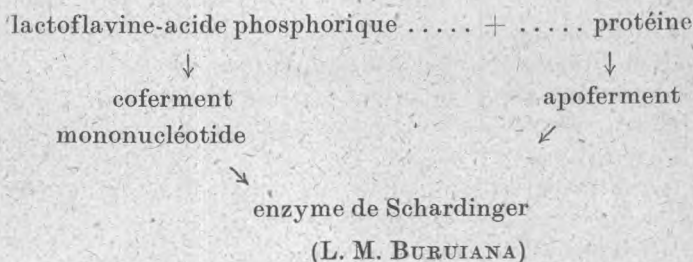
téines ou des ferments jaunes. Le groupement prosthétique (la coenzyme ou « coenzyme factor »), est très probablement un mononucléotide (L. M. BURUANA) ou un dinucléotide (E. G. BALL). La composition du mononucléotide est celle d'un ester phosphorique de la lactoflavine :



et celui du dinucléotide :



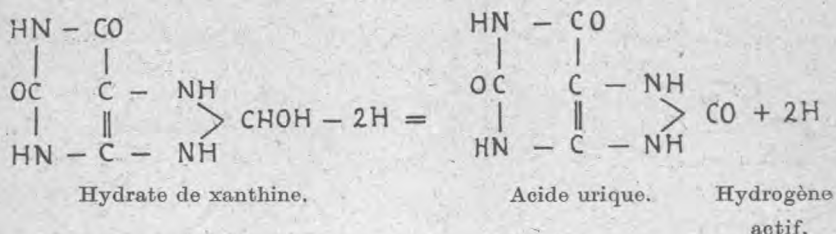
Ces coenzymes se réunissent à la copule protéinique (apoferment) pour former l'holoferment ou l'enzyme même de Schardinger. On peut donc représenter schématiquement l'enzyme de Schardinger :



ou :



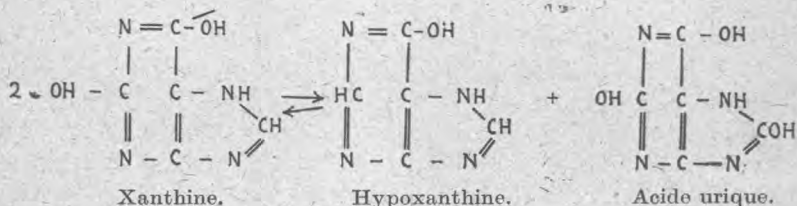




L'enzyme se combinerait avec le substrat (l'aldéhyde ou la xanthine) en facilitant le transfert de l'hydrogène actif (transporteur) sur l'accepteur (la diaphorase est un transporteur spécifique de la cozymase I).

3. Elle active l'oxygène moléculaire en le faisant susceptible d'accepter l'hydrogène. On l'appelle dans ce cas une aérodéhydrase ou déhydrase oxytrophe. Cette action est quelquefois facultative ou peut manquer complètement. Par exemple dans le cas de l'action sur la xanthine, l'enzyme est une déhydrase oxytrophe facultative, l'oxygène pouvant servir d'accepteur pour l'hydrogène actif et dans le cas de l'aldéhyde ou de la déshydrocoenzyme I, elle est une déshydrase anoxytrophe, l'oxygène ne pouvant servir comme accepteur pour l'hydrogène actif. On peut donc parler d'une action activante sur le donateur aussi bien que d'une action activante sur l'accepteur.

4. Enfin quelques auteurs ont pu démontrer que l'enzyme de Schardinger peut actionner comme une mutase en provoquant une réaction du type Canizzaro entre deux molécules de xanthine, par exemple :



A cause de ses actions sur des substrats et accepteurs variés, l'enzyme de Schardinger est connue dans la littérature scientifique sous les noms les plus divers et quelquefois inexacts. Citons : aldéshydase, aldéshydrase, aldéshydeoxydase, aldéshydomutase, aldéshydodéhydrase, déshydrase, déshydrogénase, déshydrase de Schardinger, hypoxanthine déshydrase, oxydridase, perhydridase, réductase de Schardinger, xanthine déshydrase, xanthine oxydase, etc.

Quoique à tort dénommée l'enzyme de Schardinger (on peut parler correctement de la réaction de Schardinger, le caractère enzy-

matique étant reconnu par TRÖMMSDORFF), je propose de conserver au complexe enzymatique (?) du lait discuté plus haut, le nom le plus fréquemment employé, « enzyme de Schardinger », en spécifiant toujours le substratum (donateur) et l'accepteur. La notation serait analogue à celle déjà proposée par WARBURG pour les déshydrases. Exemple :

E. S.	E. S.
bleu de méthylène	oxygène
aldéhyde	xanthine
E. S.	E. S.
bleu de méthylène	diaphorase
xanthine	déhydrocoenzyme etc.

### Séparation de l'enzyme de Schardinger du lait

C'est l'étude de la réaction de Schardinger qui a attiré l'attention des biochimistes sur les oxydations par déshydrogénation, fait généralement méconnu, qui explique aujourd'hui si brillamment les phénomènes de respiration cellulaire et donc la vie même.

Loin de s'éteindre l'intérêt pour cette vieille réaction et son agent provocateur, l'enzyme de Schardinger, croît jour par jour.

On connaît aujourd'hui dans le monde des plantes et des animaux nombre d'enzymes qui se comportent comme l'enzyme de Schardinger pouvant à la fin des fins être identiques.

L'origine de l'enzyme dans le lait peut être donc exogène, apportée par les aliments, aussi bien qu'endogène, secrétée par la cellule mammaire. On connaît le cas d'une enzyme du lait qui est directement sous l'influence de l'alimentation (la peroxydase du lait croît proportionnellement avec la quantité de la peroxydase des aliments).

Dans les deux alternatives, l'existence et l'absence de cette enzyme peut jeter une vive lumière sur le métabolisme de la glande mammaire, assez différent d'espèce à espèce.

Bien des questions à réflexion et qui seront peut être riches de conséquences.

Pour mieux étudier son rôle et son mode d'action, de nombreuses tentatives ont été faites pour isoler cette enzyme du lait :

Les techniques employées dans ce but peuvent être réparties en deux classes :

1. Techniques qui précipitent l'enzyme du lait par le sulfate d'ammonium après séparation de la caséine.

La plus ancienne est la méthode de J. ALOY et A. VALDIGUIE (1921) qui élimine la caséine à l'aide de chlorure de sodium à satura-

tion et la méthode de M. DIXON et K. KODAMA (1926) qui élimine la caséine par la présure.

2. Techniques qui utilisent la propriété de l'enzyme d'être adsorbée par les globules de graisses du lait et séparation ultérieure, de celles-ci, de l'enzyme adsorbée à leur surface.

Les techniques de la première catégorie donnent des poudres enzymatiques difficilement solubles et très peu actives. Les techniques de la deuxième catégorie sont les meilleures. On obtient des poudres impalpables quoique peu solubles, très actives et susceptibles d'être purifiées.

La technique la plus efficace est celle de H. WIELAND et Br. ROSENFELD [3] qui est la suivante :

**Technique de Wieland et Rosenfeld.** On sépare par centrifugation énergique la crème du lait de vache. On sèche dans le vide sulfurique (11 mm. mercure) en présence de potasse caustique solide. La crème qui devient dure comme le beurre refroidi, est extraite au Soxhlet avec de l'éther anhydre et puis avec de l'éther de pétrole (j'ai constaté que cette deuxième extraction est superflue). On obtient une poudre jaunâtre très légère et très friable. Elle devient impalpable par broyage au mortier. Elle est très peu soluble dans l'eau et soluble dans les solutions de phosphates. Son activité est très grande. La purification par l'hydroxyde d'aluminium indiquée par WIELANDS, diminue l'activité (fait signalé aussi par WIELAND lui-même).

Inspiré par cette technique, nous avons imaginé une autre technique plus simple qui nous a donné des extraits enzymatiques très actifs et de loin plus purs.

**Technique pour la séparation de l'enzyme de Schardinger du lait.** On centrifuge à grande vitesse (4.000-5.000 tours-minutes) le lait fraîchement traité qui donne une intense réaction de Schardinger (2-3 minutes : temps de décoloration selon notre technique) ou mieux un lait de bufflesse qui d'après nos constatations est plus riche en enzyme. Le temps de centrifugation varie entre 5-15 minutes d'après la quantité de lait à centrifuger. La crème très compacte se sépare à la partie supérieure de la fiole en un bourrelet épais.

On détache à l'aide d'un fil ou d'une baguette fine et on décante le lait en ayant soin que la crème reste dans la fiole de centrifugation. On disperse la crème restée dans la fiole dans de l'eau distillée, à l'aide d'une baguette, et on centrifuge de nouveau. On répète cette opération trois-quatre fois jusqu'à ce que l'eau de lavage ne réduise plus la liqueur de Fehling. A ce moment on disperse la crème lavée dans une quantité, la plus réduite possible, de bicarbo-



nate de soude à 1 %, et on agite le tout dans un agitateur mécanique ou même à la main dans un flacon bouché à l'émeri pendant 10 à 15 minutes.

On centrifuge de nouveau énergiquement. Il résulte un liquide un peu opalescent et extrêmement actif. Un centimètre cube de cette solution correspondant par exemple à 10 cm<sup>3</sup> de lait de vache, décolore d'après notre technique 1 cm<sup>3</sup> de solution de bleu de méthylène, instantanément (1).

Cette méthode de séparation est très rapide, elle ne dure pas plus de deux heures. Les solutions se conservent très bien en présence d'une goutte de toluène ou d'un fragment de thymol. Elles sont caractérisées par les propriétés suivantes :

Ne réduisent pas la liqueur de Fehling même après hydrolyse prolongée en milieu acide et sous pression.

Ne donnent pas la réaction de Millon, Voisenet, Heller et xanthoprotéique.

Donnent très faiblement la réaction du biuret.

Contiennent du phosphore.

Deviennent inactives par le chauffage de 2 minutes à 56° C. (dans le lait entier, dans le même temps de chauffage à 77° C.).

Ne contiennent pas de peroxydase (réaction de Dupouy négative).

Ne contiennent pas de catalase.

Précipitent par l'acétone.

(1) *Appréciation de l'activité enzymatique d'un lait par la réduction du bleu de méthylène.* Le réactif préconisé par Schardinger et qui consiste en un mélange d'aldéhyde formique et de bleu de méthylène s'altère rapidement et atténue fortement le pouvoir enzymatique dans les préparations d'enzyme pure. J'ai utilisé toujours à sa place les réactifs suivants conservés séparément :

Solution 1/10 d'aldéhyde benzoïque alcoolique (1 cm<sup>3</sup> aldéhyde benzoïque dans 10 cm<sup>3</sup> alcool éthylique 96°).

Solution 2‰ bleu de méthylène standardisé Bayer.

Pour apprécier l'activité enzymatique d'un lait, on met dans une éprouvette : 0 cm<sup>3</sup> 1 de solution d'aldéhyde benzoïque et 0 cm<sup>3</sup> 5 solution bleu de méthylène, puis on verse 10 cm<sup>3</sup> du lait à étudier chauffé préalablement à 55° C. On maintient le tout à 55° C. et on note le temps de décoloration.

Pour plus de précision, la réaction doit se faire dans les tubes de Thunberg en atmosphère d'azote ou même dans l'éprouvette comme dans l'épreuve normale, le lait ayant, au préalable subi pendant 5 minutes un barbotage d'azote pur. Ce lavage à l'azote réduit le temps de décoloration de plus de 30 %.

Dans le cas de solutions pures d'enzyme, on emploie 1 cm<sup>3</sup> solution de bleu de méthylène, et la température de fermentation ne doit pas dépasser 40° C. (nous avons travaillé à 40° C.), car l'enzyme pure a une température d'inactivation sensiblement plus basse que dans le lait entier.

L'aldéhyde benzoïque a des propriétés antiseptiques excellentes sans altérer l'enzyme sensiblement ; ainsi, les observations peuvent être prolongées longtemps sans crainte de l'éventuelle influence de la réductase microbienne.

J'ai observé à l'occasion de cette séparation du ferment de Schardinger que le contenu en phosphore des solutions varie avec le  $pH$  des solutions extractives. L'activité enzymatique est aussi liée à ce contenu en phosphore des solutions d'enzyme (fig. 1 et 2).

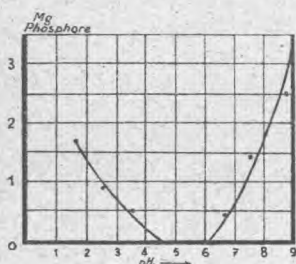


Fig. 1. — Variation du contenu en phosphore avec le  $pH$  des solutions (extraction faite sur la crème provenant de 50 cm<sup>3</sup> de lait de vache).

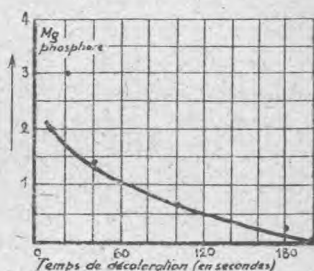


Fig. 2. — Activité de l'extrait enzymatique d'après le contenu en phosphore, pour des solutions de  $pH = 7$ .

On remarque que les solutions extractives acides, quoique contenant du phosphore, ne sont pas actives. Nous pensons que le fait s'explique par l'hydrolyse acide du complexe :

lactoflavine-acide phosphorique . . . . protéine  
enzyme de Schardinger

en :

lactoflavine-acide phosphorique = coenzyme

et

protéine = apoenzyme

On vérifie encore une fois le rôle indispensable joué dans l'activité enzymatique par la copule protéique. Pour les régions de  $pH = 4,6$  à  $6,3$  les solutions extractives sont inactives, parce que pour cette région de  $pH$  le ferment ne peut être détaché des globules gras sur lesquels il est adsorbé. Probablement qu'à ce  $pH$ , les forces d'adsorption sont maximum. Pour les  $pH$  croissants, bien entendu jusqu'à une limite définie, la solubilité du ferment croît. Pour des solutions plus alcalines que  $pH = 8$ , la graisse commence à s'émulsionner et on ne peut plus séparer l'enzyme de la graisse. Le phénomène est net, visible, l'opacité des solutions grandissant. En résumé, il est recommandable de ne pas dépasser le  $pH = 8$  pour les solutions extractives.

Une solution de bicarbonate de soude à 1‰ nous a toujours donné des résultats excellents. De ces solutions, on peut

obtenir le ferment à l'état séché soit par évaporation dans le vide sulfurique, soit par précipitation à l'acétone purifiée anhydre. Le ferment précipité par l'acétone est assez difficilement soluble dans l'eau, très soluble dans les solutions salines. Par contre, les poudres obtenues au vide sulfurique sont très facilement solubles dans l'eau. Nous sommes en train d'obtenir, par dialyse de ces poudres enzymatiques, des préparations exemptes de sels qui nous permettront de préciser leur composition chimique.

On doit souligner que les poudres enzymatiques préparées selon notre technique sont caractérisées, entre autres, par l'absence, même après hydrolyse énergique, de propriétés réductrices, ce qui nous a fait penser que l'enzyme ainsi séparée serait un mononucléotide, contrairement aux constatations d'autres chercheurs qui lui attribuent la constitution d'un dinucléotide. Malheureusement, les moyens précaires dont nous disposons ne nous permettent pas de pousser plus loin les recherches dans cette direction.

Il se peut bien que le ferment soit composé d'un mononucléotide et d'un dinucléotide, notre procédé de séparation pouvant servir à leur séparation.

### Etude potentiométrique de l'enzyme Schardinger du lait et des préparations enzymatiques obtenues par notre méthode

Si on mesure le potentiel d'une électrode de platine poli introduite dans le lait exempt d'oxygène (par barbottage avec de l'azote pur complètement désoxygéné), en comparaison avec l'électrode au calomel, on constate qu'il s'établit avec le temps une différence de potentiel assez stable reproductible, et variant entre  $-50$  à  $-60$  millivolts en rapport avec l'électrode au calomel à la température de  $40^{\circ}\text{C}$ . et  $\text{pH} = 6,80$ .

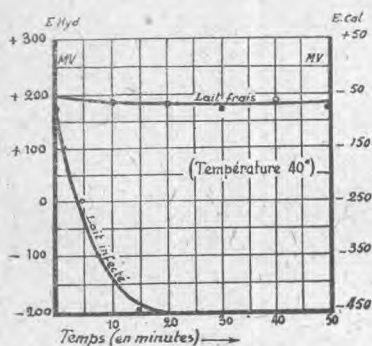


Fig. 3. — Evolution du potentiel dans le lait frais et dans le lait infecté naturellement.

On attribue cette différence de potentiel au système oxydo-réducteur propre du lait. Nous avons étudié dans un travail antérieur (1935) la nature de ce potentiel. Dans des conditions déterminées que nous verrons plus loin, le potentiel « red-ox » du lait évolue rapidement et se fixe fermement. Le système qui détermine son évolution peut être endogène ou exogène. Dans le premier cas sous l'influence des bactéries propres du lait (lait infecté naturellement) le potentiel évolue rapidement et

s'établit autour d'une valeur très basse ( $-450$  ml.V. = Electrode au calomel) (fig. 3).

Le deuxième cas peut se réaliser par addition d'un aldéhyde. C'est le cas de la réaction de Schardinger (fig. 4). Au moment A de la courbe potentiel-temps on ajoute la solution d'aldéhyde. Le potentiel commence immédiatement à baisser et la courbe du phénomène prend une allure identique. La valeur finale est un peu plus petite que dans le premier cas : EH :  $-180$  mV au lieu de EH :  $-205$  mV.

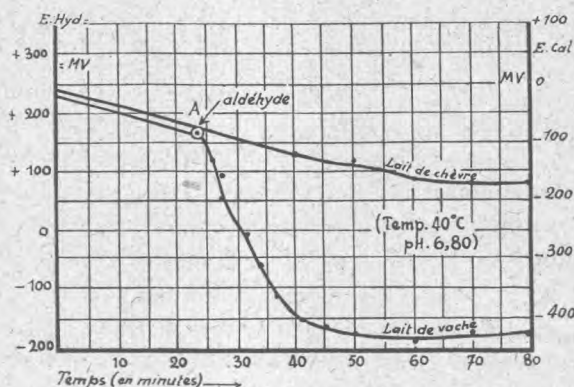


Fig. 4. — Evolution du potentiel dans le lait frais avec aldéhyde.

Cette évolution du potentiel est influencée par l'accepteur d'hydrogène comme il résulte de la courbe tracée dans la figure 5. On voit que le bleu de méthylène sert seulement d'indicateur d'oxydo-réduction, sa présence entraînant seulement pour quelques

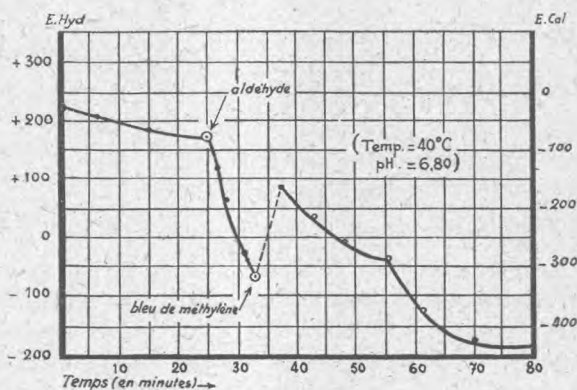


Fig. 5. — Influence du bleu de méthylène.

instants le potentiel du système dans la région de son potentiel propre de « red-ox ».

On doit à M. CLARK et à ses Collaborateurs (1925) la première observation de l'abaissement de potentiel du lait additionné d'aldéhyde, abaissement d'ailleurs contesté par K. KODAMA et M. DIXON.

Nous avons pu le reproduire toujours avec du lait frais non infecté. L'insuccès de KODAMA de reproduire la chute de potentiel observée par CLARK a une tout autre cause sur laquelle nous reviendrons plus tard. Les potentiels sont si aisément reproductibles et dépendent de conditions si précises que nous avons pu représenter les courbes « potentiel-temps » par une équation qui est celle d'une exponentielle :

$$V = e^{-f/t}$$

dans laquelle :

$V$  = le potentiel mesuré en rapport avec l'électrode au calomel.  $f/t$ , une fonction de temps de la forme  $K_1 t + K_2 t^2 + K^3 t^3 \dots$

$K_1, K_2, K_3, \dots$  sont des coefficients variables avec la température et le  $pH$  du lait. Pour le  $pH$  6,80 ( $pH$  normal du lait frais) et pour la température de  $40^\circ C.$  à laquelle on a fait la plupart des observations, les coefficients ont les valeurs :

$$K_1 = 0,0806$$

$K_2 = 0,00168$  (on peut négliger les termes  $K^3, K^4$ , ceux-ci étant trop petits).

Pour la facilité du calcul l'équation peut s'écrire :

$$\frac{V_1}{V} = e - \frac{1}{m} K_1 t - K_2 t^2 \quad m = 0,4343$$

ou en appliquant les logarithmes :

$$\log \frac{1}{V} = \log \frac{1}{V} + K_1 t - K_2 t^2$$

dans laquelle  $V$  est le potentiel au temps zéro  $t_0$  au moment de l'adjonction de l'aldéhyde et

$V$  le potentiel au temps  $t$  (= minutes) après l'adjonction de l'aldéhyde.

L'équation proposée par nous se vérifie très exactement pour des températures variant entre  $25$  et  $40^\circ C.$  et entre les  $pH = 5,7-7,5$ , régions compatibles avec l'équilibre des divers composants du lait frais normal d'ailleurs. La valeur limite de potentiel du lait additionné d'aldéhyde oscille très peu autour de la valeur  $EH =$

— 180 mV /— 430 mV en rapport avec l'électrode au calomel EC/.

Nous avons établi à l'aide de cette équation une méthode pour l'appréciation du contenu enzymatique du lait (1935).

La courbe « potentiel-temps » peut nous informer très exactement sur la présence ou l'absence de l'enzyme de Schardinger dans un lait.

On remarque dans la figure 4 l'effet de l'adjonction de l'aldéhyde sur le lait de chèvre en comparaison avec le lait de vache. On confirme l'affirmation déjà faite que le lait de chèvre ne contient pas ou contient très peu d'enzyme Schardinger.

C'est intéressant de remarquer ici que le potentiel limité dans le mélange « lait + aldéhyde » est identique au potentiel Redox de l'esther lactoflavine-phosphorique ( $E_0 = -185$  mV à  $pH = 7$  et  $t = 38^\circ$  C.) ou d'un autre système chimique bien défini, mais en aucun cas au potentiel du système ferment jaune-leucoferment jaune, qui est de loin plus positif ( $E_0 = -60$  mV.). Cela prouve que pour l'équilibre final qui s'établit, sont responsables des composés chimiques bien définis et non le système enzymatique même. Nous aurons l'occasion de vérifier plus loin, encore une fois, cette affirmation en mesurant le potentiel de l'enzyme pure.

**Thermoréduction.** A l'occasion de l'étude potentiométrique de la réaction de Schardinger nous avons observé, le phénomène suivant :

Si on chauffe le lait frais sans aldéhyde on observe que le potentiel assez constant au début, commence, avec l'accroissement de la température, à décroître, la courbe « potentiel-temps » prenant une allure identique à celle produite par l'adjonction d'aldéhyde (fig. 6).

Le retour à la température initiale de  $40^\circ$  C. ne change pas la valeur acquise, qui reste invariable.

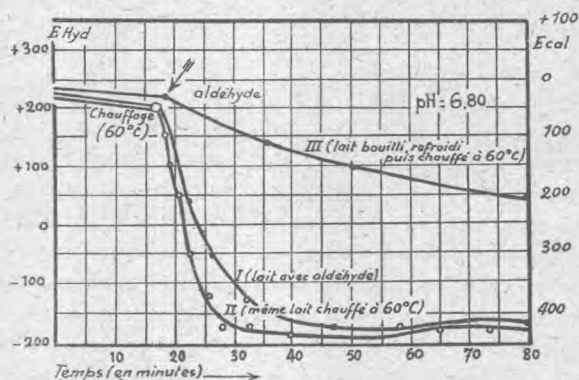


Fig. 6. — Phénomène de thermoréduction.

Ces thermo-potentiels sont réversibles, l'insufflation d'air au lieu d'azote désoxygéné en redresse le potentiel à la valeur initiale (fig. 7).

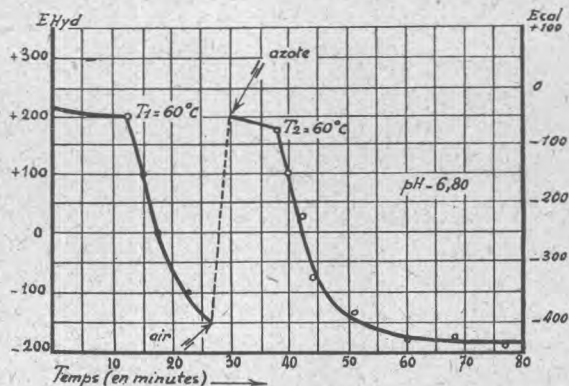
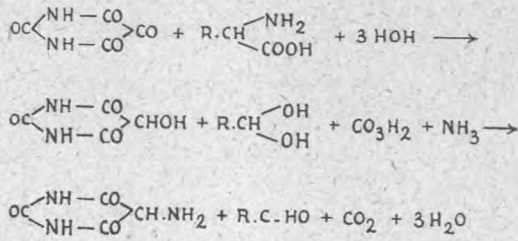


Fig. 7. — Réversibilité des thermo-potentiels.

Le bleu de méthylène ajouté, se décolore comme dans la présence d'une aldéhyde. Le lait bouilli ne présente pas ce phénomène (fig. 6, courbe III).

La conclusion qui s'impose est que la thermoréduction basse (60-65° C.) est aussi un phénomène enzymatique dû au même ferment, l'enzyme de Schardinger, le rôle de l'aldéhyde étant joué par d'autres composés chimiques qui apparaissent pendant le chauffage bas (à 60° C. ou un peu avant). On sait depuis longtemps que le lait, acquiert par chauffage, la propriété de décolorer le bleu de méthylène. UTZ attribue cette propriété à la décomposition des protéines et à l'élaboration de l'hydrogène sulfuré. CAZENEUVE et HADON attribuent cette propriété à la décomposition du lactose et G. SCHWARZ a démontré que la décoloration est due à la décomposition des substances protéiques et surtout au lactose. Dans tous ces cas, il s'agit de chauffage *hauts*, entre 95-135° C. cependant que dans notre cas le phénomène de thermo-réduction se passe à 60° C. donc beaucoup plus bas. Pour expliquer la thermo-réduction, nous rappelons l'ancienne observation de A. STRECKER (1862) que « les alfa-amino-acides, sont décomposés même à la température ordinaire par l'alloxane en aldéhyde avec dégagement d'ammoniaque et bioxide de carbone et formation d'uramide suivant les réactions :



Donc l'abaissement de potentiel par chauffage à 60° C. peut être provoqué par le même mécanisme que celui du lait additionné d'aldéhyde. On peut résumer :

Observation	Nature de la réduction	La réduction est provoquée		Valeur du potentiel limite
		par	sur	
Décoloration du bleu de méthylène par le lait infecté par les bactéries. (DUCLAUX)	Enzymatique.	Une déshydrase sécrétée par les bactéries et peut-être par l'enzyme de Schardinger	Une aldéhyde ou une hydroxypurine résultant de l'action des bactéries.	— 185 — 205 mV (mesuré par CLARK, BURUANA).
Décoloration du bleu de méthylène par le lait frais additionné d'aldéhyde. (SCHARDINGER)	Enzymatique.	L'enzyme de Schardinger.	Aldéhyde ou hydroxypurine	— 165 — 185 mV (mesuré par CLARK, BURUANA).
Décoloration du bleu de méthylène par le lait chauffé à hautes températures à 95°-135° C. (ULTZ et autres auteurs.)	Chimique.	Divers composés réducteurs résultant de la décomposition du lactose et des protéides.		?



Observation	Nature de la réduction	La réduction est provoquée		Valeur du potentiel limite
		par	par	
Décoloration du bleu de méthylène par le lait chauffé à basse température 60° C. Observation faite en atmosphère désoxygénée. (BURUANA).	Enzymatique.	L'enzyme de Schardinger.	Un composé aldéhydique résultant peut-être de la décomposition des alfa-aminoacides ou d'autres composés du lait.	— 185 mV (mesuré par BURUANA).

### Potentiels des solutions d'enzyme Schardinger séparées du lait

Dans ce qui précède, nous avons vu que la méthode potentiométrique est une méthode très sensible pour détecter la présence et même mesurer la quantité d'enzyme de Schardinger du lait. Nous avons pensé à l'utiliser aussi pour l'étude des préparations enzymatiques obtenues par notre technique de séparation. Dans ce qui suit nous indiquons les résultats de quelques mesures potentiométriques. Les courbes de la figure 8 montrent l'évolution du potentiel d'une électrode pt (platine poli) dans la solution de phosphate (pH = 6,8) d'une préparation enzymatique obtenue par la méthode de H. Wieland et d'une préparation du même lait obtenue selon notre méthode.

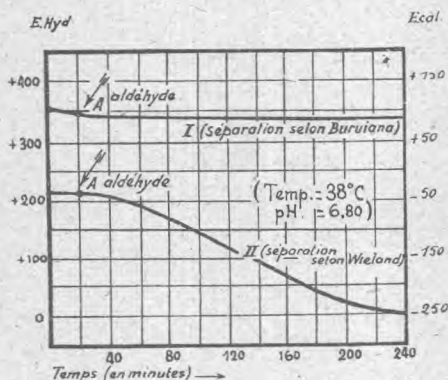


Fig. 8. — Evolution du potentiel (aldéhyde)

Au point indiqué dans la figure 8 par la lettre A on introduit la solution d'aldéhyde. On remarque que l'effet est presque nul dans la solution d'enzyme préparée selon notre méthode et réduit dans le cas de la solution enzymatique préparée par la méthode de H. Wieland (courbe II).

L'effet de l'adjonction de l'aldéhyde dans le lait frais (fig. 4) et celui produit par

l'aldéhyde dans les solutions d'enzymes pures sont très différents.

Si l'on introduit un accepteur d'hydrogène (bleu de méthylène ou carmin d'indigo) le potentiel baisse immédiatement (fig. 9), la valeur limite étant celle de l'indicateur respectif (plus basse dans le cas du carmin d'indigo), donc c'est le potentiel même du système oxydo-réducteur de l'indicateur ou accepteur ajouté qu'enregistre l'électrode de platine poli dans ce cas et non de l'enzyme.

L'oxygène moléculaire peut servir aussi d'accepteur pour l'hydrogène activé par l'enzyme. Si on ajoute de l'aldéhyde dans une

solution d'enzyme en aérobiose (au lieu d'azote pur, on fait barboter dans la solution d'enzyme un courant d'air) le potentiel croît brusquement jusqu'à une valeur bien supérieure et puis reste constant (fig. 10).

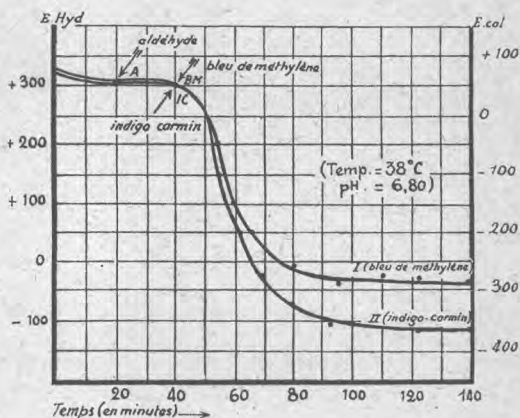


Fig. 9. — Evolution du potentiel (bleu de méthylène)

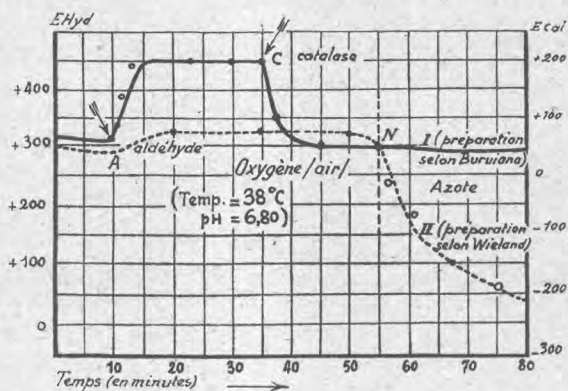


Fig. 10. — Evolution du potentiel en aérobiose et anaérobiose.

L'explication que nous fournissons est que l'enzyme active aussi l'oxygène moléculaire qui accepte l'hydrogène activé par la même

enzyme et il apparaît de l'eau oxygénée qui provoque l'accroissement du potentiel.

Une quantité plus grande d'eau oxygénée inhibe l'enzyme et le potentiel reste constant.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons fait l'expérience suivante :

Immédiatement après que le potentiel se fixe, nous introduisons (point C de la courbe I de la fig. 10) quelques gouttes d'une solution très pure de catalase de foie de brebis. On constate l'abaissement instantané du potentiel à la valeur initiale. Le fait est vérifié aussi parce que dans le cas d'une préparation enzymatique, selon la méthode de H. Wieland, qui contient de la catalase, on obtient une autre marche du potentiel en aérobiose (courbe II de la même figure).

De toute cette série d'expériences, on peut déduire les faits suivants :

1. Le potentiel limite obtenu lors de l'addition de l'aldéhyde dans le lait frais est dû à un système chimiquement bien défini, propre au lait et qui accepte l'hydrogène aldéhydique mobilisé par l'enzyme de Schardinger. *C'est le potentiel de ce système qu'on mesure.*

Dans les solutions pures d'enzymes, c'est au contraire le potentiel du système oxydo-réducteur de l'accepteur ajouté (aldéhyde ou hydroxypurine) qui détermine la valeur de ce potentiel.

C'est ici l'explication de l'insuccès de K. KODAMA de reproduire le phénomène signalé par CLARK (abaissement du potentiel du lait frais additionné d'aldéhyde). Il avait expérimenté avec une *solution d'enzyme* tandis que CLARK prenait du lait entier.

2. La mesure du potentiel des solutions enzymatiques en présence d'une aldéhyde peut constituer un criterium très sûr quant à la pureté de l'enzyme. Le potentiel doit rester constant si la préparation est assez pure, ou évoluer vers la valeur limite du potentiel de l'accepteur ajouté:

3. L'oxygène peut, lui aussi, servir d'accepteur d'hydrogène — fait très bien mis en évidence par la méthode potentiométrique.

#### **Peut-on parler d'une affinité envers l'accepteur ?**

La question de l'affinité envers le substrat ou donateur a été résolue dans le cas de l'enzyme de Schardinger par l'hypothèse que l'enzyme est formée par 3 à 4 entités, bien distinctes : la xanthine-oxydase, l'aldéhydrase, la déhydrocoenzyme-oxydase et une mutase.

Existe-t-il une affinité préférentielle envers l'accepteur ? Dans un mélange de plusieurs accepteurs, qui sera réduit le premier ?

On a observé depuis longtemps que le bleu de méthylène décoloré dans la réaction de Schardinger se recoloré immédiatement par agitation, fait attribué à l'influence de l'oxygène de l'air. Nous avons observé le fait bien curieux que le lait dans lequel barbotte même de l'azote pur, pendant la réaction de Schardinger se décoloré très difficilement ou même pas du tout.

A ce qu'il paraît ce n'est pas l'oxygène lui-même qui réoxyde le bleu de méthylène mais les traces d'eau oxygénée qui ont pris naissance après la réduction du bleu de méthylène. Donc l'hydrogène actif réduit dans l'ordre — le bleu de méthylène — l'oxygène moléculaire.

A. BACH a signalé que les nitrates peuvent servir aussi comme accepteurs d'hydrogène dans la réaction de Schardinger.

La marche de la réduction des nitrates est très intéressante.

**Expérience.** Dans une fiole conique bouchée à l'émeri on met 100 cm<sup>3</sup> de lait de vache frais.

1 cm<sup>3</sup> de solution 1/10<sup>e</sup> d'aldéhyde benzoïque et,

10 cm<sup>3</sup> de solution de nitrate de sodium 10% sans nitrites.

On met le tout à l'étuve à 55° C. Après un temps variable, on prend des parties aliquotes et on détermine les nitrites formés par la technique décrite dans un travail antérieur. Nous avons obtenu des résultats variables qui peuvent se résumer dans les catégories ci-après.

Cette réoxydation des nitrites, a été observée aussi par Bach, et HAAS et HILL [4] l'ont expliquée par l'hypothèse de la coexistence dans le lait de deux enzymes différentes « l'atite » qui réduit les nitrates et « l'itate » qui oxyde les nitrites.

Nous expliquons cette réoxydation des nitrites par l'apparition de traces d'eau oxygénée.

#### PREMIÈRE CATÉGORIE

Temps (minutes)	Gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait
30	180 (Après une
60	240 valeur ma-
90	260 + M ximum la
120	240 quantité
250	220 des nitrites
480	190 décroît con-
540	170 tinuelle-
1320	145 ment.)
1680	137
1800	150
1920	166

## DEUXIÈME CATÉGORIE

30	120	(Après un
60	195 + M	maximum,
90	180	la quantité
120	120	des nitrites
240	80	passe par un
480	25—m	minimum
540	50	pour
1320	100	croître en-
1680	110	core une
1800	115	fois avant
1920	110	de décroî-
		tre.)

Au commencement, la tension de l'hydrogène mobilisé par l'enzyme est assez petite et ne peut réduire que les nitrates. Au fur et à mesure que la tension de l'hydrogène actif croît, l'oxygène peut aussi servir d'accepteur pour cet hydrogène. L'eau oxygénée apparue réoxyde une partie des nitrites formés. La catalase, existante dans le lait, détruit l'eau oxygénée formée et la réduction totale des nitrates dépendra aussi de la quantité de la catalase du lait.

Ainsi peut s'expliquer pourquoi les laits diffèrent quant à la reoxydation des nitrites formés.

On peut illustrer cette explication par les expériences suivantes entreprises avec nos préparations enzymatiques exemptes de catalase :

*Expérience I :*

La réduction des nitrates par une solution tampon ( $pH = 6,80$ ) d'enzyme (provenant de  $100\text{ cm}^3$  de lait de vache et, extrait selon notre technique) +  $10\text{ cm}^3\text{ NO}_3\text{Na } 10\%$  +  $1\text{ cm}^3$  solution aldéhyde benzoïque  $1/10^e$  ; température de fermentation : +  $37^\circ\text{ C}$ .

Temps de fermentation	Gamma $\text{NO}_2\text{Na}$ dans $5\text{ cm}^3$ de solution
15	210
30	308
60	98
90	3
120	0
240	0
480	0
540	0
720	0

*Expérience II :*

La même solution enzymatique + 1 cm<sup>3</sup> solution catalase de foie de brebis (1).

Temps de fermentation	Gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de solution
15	238
30	410
60	506
90	792
120	1061
240	1520
480	1825
540	2000
720	2100

De toutes ces observations on peut conclure que l'hydrogène « préfère » réduire en ordre : le bleu de méthylène, les nitrates et l'oxygène. On doit tenir compte de cette affinité dans les techniques utilisées pour l'appréciation de l'activité enzymatique du lait.

Les techniques au bleu de méthylène sont très sensibles et doivent être utilisées strictement en aérobiose pour avoir des résultats comparables.

Les techniques utilisant la réduction des nitrates sont les plus indiquées dans les conditions normales en tenant compte de la vitesse de reoxydation des nitrites.

Les techniques utilisant l'oxygène comme accepteurs ne sont pas recommandables car l'eau oxygénée apparue diminue l'activité du ferment ou peut même le tuer.

La technique potentiométrique que nous avons utilisée et qui emploie comme accepteur le système propre du lait est la plus recommandable étant la plus sensible et conservant l'intégrité de l'enzyme.

### Conclusions

Dans le présent travail nous faisons un résumé des connaissances actuelles sur l'enzyme de Schardinger.

1. La technique potentiométrique appliquée par nous pour l'étude de l'action de cette enzyme s'est montrée très précieuse pour

(1) On doit tenir compte du fait que les préparations catalasiques de foie peuvent contenir une aldéhydedeshydrase analogue à l'enzyme de Schardinger qui réduit aussi les nitrates. Dans notre cas, l'activité deshydrasique de la préparation était presque nulle.

éclairer son mécanisme et la cinétique de la réaction. Le phénomène de réduction peut être représenté par une exponentielle de la forme :

$$V = e^{-t/t'}$$

équation très correctement vérifiée par les mesures de potentiels faites après l'adjonction d'une aldéhyde.

2. L'étude potentiométrique de la réaction de Schardinger nous a révélé un phénomène que nous avons appelé *thermoréduction* et qui consiste dans l'accroissement du pouvoir réducteur du lait lors du chauffage à 60° C. (chute du potentiel analogue à celle provoquée par l'adjonction d'une aldéhyde).

3. Pour mieux étudier l'enzyme de Schardinger nous avons établi une technique nouvelle, rapide et sûre, pour la séparation de l'enzyme du lait.

Les propriétés et la composition chimique probable de cette enzyme ainsi séparée sont discutées dans le présent travail.

4. La méthode potentiométrique s'est montrée aussi très utile, pour l'étude des extraits enzymatiques et pour apprécier leur pureté.

5. Le rôle de l'accepteur dans la réaction de Schardinger est analysé à l'aide de la réduction des nitrates. Le dosage des nitrites apparus, selon une technique établie par nous dans un travail antérieur, s'est montré un bon moyen pour élucider cette question.

6. Plusieurs observations nouvelles et remarques sont faites à l'occasion du présent travail, en liaison avec l'enzyme de Schardinger.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. L. RODKEY et E. G. BALL. *The Journ. of Lab. a. Clinic. Med.*, vol. XXXI, n° 3, 354-356, 1946.
- [2] J. PIEN. *Le Lait*, t. XXV, n° 249-250, p. 311-320, 1945.
- [3] H. WIELAND et Br. ROSENFELD. *Liebig's Ann.*, 12, 32-78, 1929.
- [4] P. HAAS et Th. HILL. *Biochem. Journ.*, 17, 671, 1923.