

ENZYMES IMMOBILISEES—V

EMPLOI DES VANACRYLS DANS LA PREPARATION DE NOUVEAUX DERIVES INSOLUBLES DE L'UREASE*

E. BROWN et A. RACOIS

Laboratoire de Synthèse Organique, Faculté des Sciences, B.P. 535, 72017—Le Mans Cedex, France

(Received in France 4 May 1973; Received in the UK for publication 8 October 1973)

Abstract—The polyaldehydic vanacryls were successfully used for immobilizing urease according to the probable scheme: $\text{Pol}-\text{CHO} + \text{H}_2\text{N}-\text{Enz} \rightarrow \text{Pol}-\text{CH}=\text{N}-\text{Enz}$. The urease derivatives thus obtained were both water-insoluble and biologically active. The ratios of residual enzymic activity were found to vary in the range 44–55% for a fixation ratio of 55–72% with regard to the amount of enzyme used in the immobilization reaction.

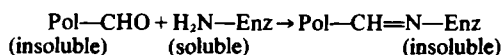
Un certain nombre de combinaisons insolubles uréase/support macromoléculaire sont actuellement connues (voir par exemple¹⁻⁶). Dans plusieurs cas le support macromoléculaire possède des groupements diazoïques¹⁻³ qui réagissent sur les cycles phénoliques de la tyrosine contenue dans l'enzyme selon une réaction de copulation classique. Ces dérivés insolubles contiennent de 15 à 60 mg d'enzyme pour 100 mg de support et l'activité enzymatique résiduelle est la moitié de celle de l'uréase initiale.¹ L'uréase a également été enfermée dans de petites capsules semiperméables de polystyrène, d'éthylcellulose ou de silicones. L'activité résiduelle des combinaisons ainsi obtenues est environ le sixième de celle de l'uréase initiale utilisée.⁶ On a souligné récemment l'intérêt que pouvait présenter une uréase immobilisée, notamment dans la construction des reins artificiels⁷ et dans le dosage en continu de l'urée.¹

En ce qui nous concerne, nous avons décrit^{4,5} un nouveau type d'uréase immobilisée, obtenue en faisant réagir cette enzyme sur des polyméthacrylates d' ω -iodo n-alcoyle (Poliiodals). En utilisant 50 mg d'enzyme pour un gramme de polymère, nous avons obtenu des fixations de 10 à 15 mg d'uréase, l'activité enzymatique résiduelle (AER dans la suite) variant suivant les cas de 25 à 75% de l'activité spécifique originelle.

Le présent travail

Dans le but de préparer d'autres types d'enzymes insolubilisées, nous nous sommes proposé d'utiliser des supports macromoléculaires différents de ceux utilisés jusqu'à présent et dont nous avons déjà indiqué les préparations.⁸ Ces polymères sont des polyméthacrylates de vanilline (Vanacryls) ou des

copolymères de méthacrylate de vanilline et d'alcool allylique (Covanacryls). Ils comportent par conséquent des chaînes latérales terminées par des groupements aldéhydes aromatiques susceptibles de réagir en milieu aqueux avec les groupements $-\text{NH}_2$ libres des enzymes⁹⁻¹³ suivant le Schéma probable:



Dans la suite du texte, les copolymères utilisés seront désignés sous les noms de Covanacryls-1, 2, 3 et 5 respectivement, les derniers chiffres indiquant le nombre de moles de "méthacrylate de vanilline" utilisées par mole d'alcool allylique dans la préparation du copolymère.

Préparation d'uréase insolubilisée. Nous avons fait réagir l'uréase sur le Vanacryl et les Covanacryls en solution tampon phosphate 0.2 M à pH = 7.5. Après un temps de contact de 24 h, les dérivés insolubles obtenus ont été filtrés et lavés avec une solution M de NaCl puis avec de l'eau (jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique décelable) et enfin conservés à froid soit à l'état sec, soit en suspension dans l'eau distillée.

Mesure de l'activité des combinaisons insolubles uréase-support. L'activité de ces dérivés insolubles de l'uréase a été mesurée par dosage colorimétrique du carbonate d'ammonium formé par hydrolyse enzymatique de l'urée.¹⁴

Une courbe d'étalonnage de l'activité enzymatique en fonction de la masse d'enzyme utilisée a été tracée (voir Partie Expérimentale) pour l'uréase initiale dans des conditions opératoires identiques à celles utilisées pour ses dérivés insolubles, ce qui a permis de calculer la masse m_1 d'uréase native ayant la même activité que le dérivé insoluble. La masse m_2 d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats provenant de la réaction de

* 4 ème mémoire: E. Brown et A. Racois, *Tetrahedron*, sous presse.

fixation a été déterminée par incubation avec une solution d'urée dans les mêmes conditions que l'uréase native. Pour calculer m_2 , nous avons admis que l'uréase des filtrats avait conservé son activité originelle. La masse m_1 d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence $m_1 = m_0 - m_2$, m_0 représentant la quantité d'uréase mise en présence du polymère en vue du greffage. L'activité relative r du dérivé uréase-support vis-à-vis de l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = m_1/m_0$. Les masses m_0 d'uréase utilisée pour la fixation étaient de 10 mg pour 100 mg de polymère sec ou préalablement "humidifié" dans le tampon phosphate.

Nous avons constaté que pour un même support macromoléculaire, la masse d'enzyme fixée augmente sensiblement quand le polymère utilisé est préalablement humidifié dans la solution tampon phosphate. De même, l'activité enzymatique résiduelle (AER dans la suite du texte) des dérivés obtenus est nettement plus élevée quand ceux-ci sont conservés en suspension dans l'eau plutôt qu'à l'état sec. Après avoir été maintenus en suspension dans l'eau pendant 8 jours, les dérivés avaient sensiblement la même activité que lors de leur préparation. L'introduction dans les polymères de fonctions alcool augmente d'abord le taux de fixation et l'activité enzymatique résiduelle (AER), mais trop de monomère alcool dans le mélange à polymériser (dont résultent les covanacryls) fait ensuite décroître le taux de fixation sans modifier l'AER (Tableau D, Partie Expérimentale).

Nous avons mesuré l'activité de l'uréase initiale et celle d'une combinaison uréase/support en fonction du pH, ce qui a conduit à tracer deux courbes en cloche indiquant une activité maximale à pH 7, mais avec une plus faible pH-dépendance de l'activité pour le dérivé que pour l'enzyme native (Fig 1). D'une manière générale, ainsi qu'il est indiqué en détail dans la Partie Expérimentale, nous

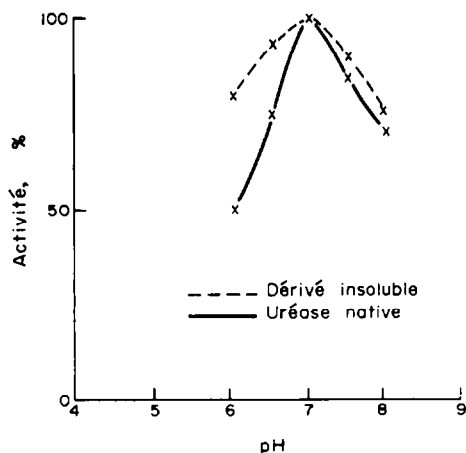


Fig 1.

avons constaté que le taux de fixation de l'uréase, par rapport à la masse d'enzyme mise en oeuvre, variait de 55 à 72% pour une activité résiduelle (AER) comprise entre 44 et 55%.

Afin de déterminer la quantité approximative d'uréase fixée sur le support par simple physisorption,^{12,15} nous avons fait incubé dans les conditions habituelles une solution tamponnée de 100 mg d'uréase en présence de 100 mg d'un polymère dépourvu de groupements fonctionnels réactifs, le polyméthacrylate de gaïacol. Ce polymère déjà décrit⁸ a été préparé de la même façon que les Vanacryls, afin qu'il ait une tacticité et un degré de polymérisation comparables aux précédents. Nous avons ainsi constaté que 10% de l'uréase initiale restaient assez fortement adsorbés sur ce polymère non réactif, ce qui est en accord avec les résultats observés dans le cas de la trypsine et du polyméthacrylate de n-butyle.⁵ De plus, ni l'enzyme physisorbée, ni l'enzyme présente dans les filtrats, n'avaient été dénaturées de façon sensible au cours de l'opération. Ce dernier résultat justifie nos calculs précédents de la masse d'enzyme fixée $m_1 = m_0 - m_2$.

Nous avons ensuite cherché à réaliser des fixations de quantités plus importantes d'enzyme sur nos polymères en utilisant 50 mg d'uréase pour 100 mg de polymère. Nous avons ainsi fixé 14 mg (28%) d'enzyme et le dérivé obtenu présentait une AER de 50%, proche par conséquent de celle des autres dérivés.

Nous avons fait passer en continu et à faible débit (voir Partie Expérimentale) une solution d'urée à 2 g/l, tamponnée à pH = 7.5 dans une colonne thermostatée à 30° et contenant une "uréase insolubilisée" mélangée à de la célite servant de support et de ralentisseur de débit. Nous avons mesuré, tous les jours et pendant une semaine, la quantité d'urée transformée en carbonate d'ammonium, ce qui a conduit à tracer une courbe donnant l'AER du dérivé en fonction du temps. Nous avons ainsi obtenu une courbe indiquant une perte rapide d'activité du dérivé les premiers jours, avec, après sept jours d'utilisation continue, une diminution de plus de 90% (Fig 2).

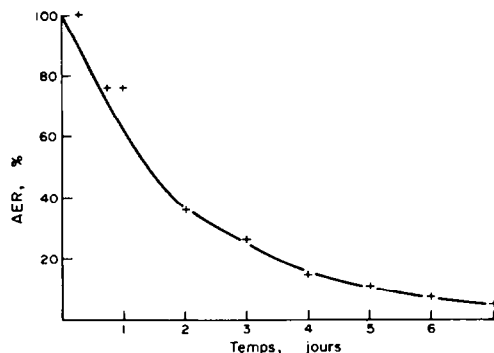


Fig 2.

Dans une colonne identique à la précédente et dans les mêmes conditions opératoires, nous avons fait passer à faible débit une solution tamponnée d'urée à 0.5 g/l sur une quantité plus importante de dérivé insoluble. En dosant la solution écoulée, nous avons constaté que pendant trois jours, toute l'urée mise en solution avait été transformée en carbonate d'ammonium.

Nous avons mesuré chaque semaine l'activité d'un même dérivé insoluble de l'uréase obtenu à partir du Vanacryl et conservé en suspension dans l'eau à 2°, ce qui a conduit à tracer une courbe de l'AER en fonction du temps. La droite obtenue indique qu'après six semaines de conservation, le dérivé a perdu plus de 85% de son activité originelle (Fig 3).

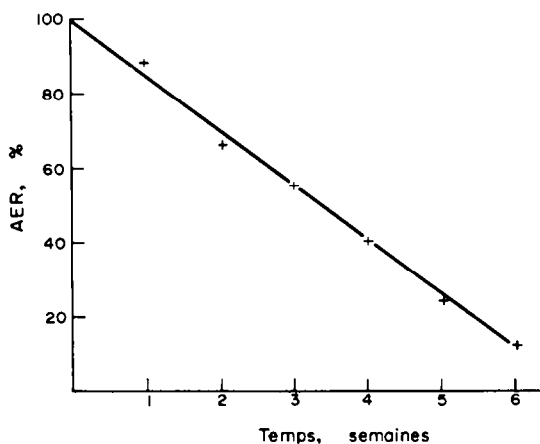


Fig 3.

Conclusion

La fixation sur les Vanacryls et Covanacryls de l'uréase par ses groupements basiques réactifs fournit des dérivés insolubles dans l'eau. L'activité enzymatique résiduelle (AER) des dérivés obtenus paraît dépendre assez peu du nombre de groupements hydroxyyles présents dans les différents Covanacryls utilisés; par contre, la fixation d'enzyme augmente comme le nombre de groupements aldéhydes présents. Les Covanacryls semblent plus avantageux que les polyméthacrylates d'iodoalcoyle utilisés précédemment,⁵ aussi bien du point de vue de la fixation que de l'AER des dérivés obtenus. Une fraction non négligeable d'enzyme semble être fixée par simple physisorption, ce qui exige des lavages importants et répétés du dérivé insoluble si on désire que l'activité de ce dernier reste constante au cours de son utilisation dans des réactions enzymatiques ultérieures.

Les dérivés obtenus, plus stables que l'uréase soluble initiale, peuvent être utilisés avec succès pour des réactions enzymatiques en continu pendant plusieurs jours de suite.

Enfin, la comparaison des présents résultats avec

certains de ceux indiqués dans la littérature (et que nous avons rappelés brièvement au début de cet exposé) montre que les dérivés insolubles de l'uréase obtenus à partir des Vanacryls présentent des propriétés analogues à celles de la plupart des dérivés correspondants préparés par d'autres auteurs selon des méthodes différentes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Fixation de l'uréase sur le polyméthacrylate de vanilline (Vanacryl)

Dans une fiole conique de 25 cm³, on agite magnétiquement à 4° ou 20°, pendant 24 ou 48 h, une suspension de 100 mg de polymère⁸ et de 10 mg d'uréase de Sigma dans 5 cm³ d'une solution tampon phosphate 0.2 M à pH = 7.5. Les dérivés insolubles sont séparés par filtration puis lavés soigneusement en plusieurs fois sur verre fritté no 3 (Prolabo) avec une solution de chlorure de sodium M (total: 50 cm³), puis avec de l'eau distillée (total: 45 cm³). Les filtrats sont rassemblés (100 cm³ au total) et le dérivé insoluble est conservé à 2° soit à l'état sec, soit en suspension dans 20 cm³ d'eau distillée.

Mesure de l'activité de l'uréase en solutions standard (selon le même protocole opératoire que celui utilisé par la suite pour mesurer l'activité des dérivés insolubles uréase-support et de l'uréase non fixée)

A x cm³ de solution A obtenue en mélangeant 5 cm³ de solution tampon phosphate 0.2 M (pH = 7.5), 50 cm³ de chlorure de sodium M et 45 cm³ d'eau distillée, on ajoute une quantité y cm³ d'une solution B obtenue en dissolvant 10 mg d'uréase dans 100 cm³ de solution A, de telle façon que x + y = 10 cm³ de solution C. La solution B est laissée 24 h à 2° avant son utilisation.

Dans un bécher de 50 cm³ muni d'une agitation magnétique, on place les 10 cm³ de la solution C à la température de 30° et on ajoute 20 cm³ d'une solution d'urée à 2 g/l, à la même température. Après 5 min d'incubation à 30°, on verse 0.5 cm³ d'acide chlorhydrique 0.1 N pour détruire l'enzyme. On obtient ainsi 30.5 cm³ de solution D.

On place 0.2 cm³ de solution D dans la cuve d'un spectrophotomètre Beckmann, auquel on ajoute 3 cm³ d'eau distillée et 0.5 cm³ de réactif de Nessler.¹⁴ On mesure l'absorbance de cette solution E à 490 nm, ce qui permet de tracer une courbe d'étalonnage de l'absorbance

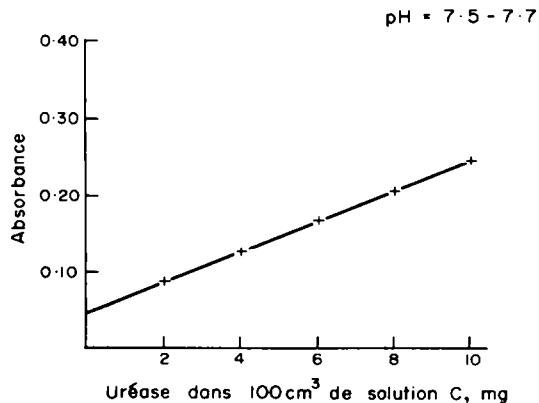


Fig. 4.

en fonction de la masse d'uréase utilisée, en prenant l'eau distillée comme référence; la courbe obtenue est rectiligne (Fig 4).

Après filtration sur verre fritté no 3, la solution B présente la même activité: il n'y a pas de désactivation par filtration.

Mesure de l'activité des dérivés insolubles et de l'uréase non fixée

Un dixième de la masse du dérivé séché est mis en suspension dans 10 cm³ de solution A. Après 30 min d'agitation magnétique à 30°, on opère comme ci-dessus. Pour doser l'activité des dérivés conservés en suspension (voir ci-dessus), on agite magnétiquement ceux-ci pendant 30 min à 30°, puis on verse, dans un bécher de 50 cm³, 2 cm³ (soit 1/10) de cette suspension, auxquels on ajoute 8 cm³ de solution A (total 10 cm³). On obtient ainsi 10 cm³ de solution C (voir ci-dessus).

Après addition d'acide chlorhydrique, la suspension obtenue dans l'un ou l'autre cas est filtrée et le filtrat

recupéré est dosé par colorimétrie selon la méthode habituelle.

Le filtrat contenant l'uréase non fixée et constitué par 100 cm³ d'une solution d'uréase dans la solution A. On prend 10 cm³ (soit 1/10) de ce filtrat et l'on mesure son activité en admettant que l'activité spécifique de l'uréase non fixée n'a pas été modifiée par la présence du polymère (ce qui est d'ailleurs démontré plus loin).

Dans les tableaux ci-après, qui rassemblent les résultats obtenus, m₁ est la masse d'uréase native ayant même activité que le dérivé insoluble considéré, m₂ est la masse d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats. La masse m₃ d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence m₃ = (m₀ - m₂)mg, où m₀ est la masse d'enzyme mise en jeu. Les masses m₁ et m₂ sont déterminées d'après la courbe d'absorbance ci-dessus. L'abréviation Ab représente l'absorbance. L'activité relative r du dérivé uréase/support par rapport à l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = (m_1 / (m_0 - m_2)) = (m_1 / m_3)$. (r × 100 représente l'AER du dérivé).

(A) Fixation sur polymère séché. Dérivé conservé à l'état sec. (m₀ = 10 mg)

Polymère	Temps de réaction (Température)	m ₁		m ₂		m ₃ mg	r × 100 (AER)
		Ab.	mg	Ab.	mg		
Vanacryl	24 h (4°)	0.145	1	0.17	6.2	3.8	27
Covanacryl-5	24 h (4°)	0.07	0.25	0.17	6.2	3.8	7

(B) Fixation sur polymère préalablement humidifié pendant 24 h. Dérivé conservé à l'état sec. (m₀ = 10 mg)

Polymère	Temps de réaction (et température)	m ₁		m ₂		m ₃ mg	r × 100
		Ab.	mg	Ab.	mg		
Vanacryl	24 h (4°)	0.075	0.3	0.155	5.5	4.5	7
Covanacryl-5	24 h (4°)	0.085	0.4	0.165	6	4	10

(C) Fixation sur polymère préalablement humidifié pendant 24 h. Dérivé conservé en suspension dans l'eau. (m₀ = 10 mg)

Polymère	Temps de réaction (et température)	m ₁		m ₂		m ₃ mg	r × 100
		Ab.	mg	Ab.	mg		
Vanacryl	24 h (4°)	0.145	2.5	0.13	4.3	5.7	44
Vanacryl	48 h (4°)	0.145	2.5	0.13	4.3	5.7	44
Vanacryl	48 h (20°)	0.10	1.4	0.155	5.5	4.5	31

Ces dérivés ont conservé la même activité après 8 jours de stockage en suspension à 2°.

(D) Fixation sur divers copolymères dans les mêmes conditions que ci-dessus (C)

Polymère	Temps de réaction (et température)	m ₁		m ₂		m ₃ mg	r × 100
		Ab.	mg	Ab.	mg		
Vanacryl	24 h (4°)	0.145	2.5	0.13	4.3	5.7	44
Covanacryl-5	24 h (4°)	0.195	3.8	0.10	2.8	7.2	53
Covanacryl-3	24 h (4°)	0.18	3.4	0.12	3.8	6.2	55
Covanacryl-2	24 h (4°)	0.19	3.2	0.13	4.2	5.8	55
Covanacryl-1	24 h (4°)	0.165	3	0.135	4.5	5.5	54.5

(E) Fixation d'une masse plus grande d'uréase ($m_0 = 50$ mg)

La fixation se fait dans les conditions habituelles sur 100 mg de polymère, mais on lave avec quatre fois plus de solution de chlorure de sodium et d'eau distillée. **Résultats obtenus:** Polymère: Covanacryl-3; Temps et température de fixation: 24 h à 4°; $m_1 = 3.5$ mg; $m_2 = 4.5$ mg; Masse fixée = 14 mg (taux de fixation = 28%); AER = 50%.

(F) Adsorption d'uréase sur le polyméthacrylate de gaïacol

Le polyméthacrylate de gaïacol est mis en présence d'uréase dans les mêmes conditions opératoires que pour les Vanacryls utilisés ci-dessus. La masse de polymère mise en oeuvre est de 100 mg et la masse d'uréase de 10 mg. Pour mesurer l'activité enzymatique du dérivé on prend 1/4 de la suspension au lieu de 1/10 habituellement: la valeur m_1 trouvée doit être divisée par 2.5 pour représenter la masse M d'uréase ayant même activité que le dérivé. m_2 est la masse d'uréase fixée par physisorption. **Résultats obtenus:** Polymère: Polyméthacrylate de gaïacol; Temps et température de fixation: 24 h à 4°; $m_1 = 2.7$ mg (Absorbance = 0.10); $m_2 = 9$ mg (Absorbance = 0.225); Masse fixée: $m_3 = 1$ mg (Taux de fixation par physisorption = 10%). $M = (m_1/2.5) = 1$ mg.

(G) Activités comparées d'un dérivé insoluble uréase/covanacryl-2 et de l'uréase soluble en fonction du pH

On met 2 cm³ (soit 1/10) d'une suspension de dérivé insoluble uréase-covanacryl-2 (préparé selon le paragraphe D), en contact avec 8 cm³ d'une solution tampon phosphate 0.2 M permettant de fixer le pH du mélange. On agite 10 min à 30° puis on ajoute 20 cm³ d'urée à 2 g/l aux mêmes température et pH. On laisse incuber 5 min à 30° puis on ajoute 0.5 cm³ d'acide chlorhydrique 0.1 N et on filtre sur verre fritté. L'activité est mesurée comme précédemment pour les solutions-standard. On observe une activité maximale à pH = 7 comme pour l'uréase (5 mg dans 100 cm³ de solution A) étudiée dans les mêmes conditions opératoires.

L'activité relative r du dérivé insoluble aux différents pH a été calculée comme étant le rapport entre la masse m d'uréase native ayant la même activité à pH = 7.5 que le dérivé au pH considéré, et la masse correspondante trouvée pour ce même dérivé à pH 7. On fait de même pour l'uréase soluble.

pH		Absorbance	m (mg)	r (%)
6	uréase	0.145	5	49
	dérivé	0.21	8.2	80
6.5	uréase	0.20	7.7	75
	dérivé	0.235	9.5	93
7	uréase	0.25	10.2	100
	dérivé	0.25	10.2	100
7.5	uréase	0.22	8.7	85
	dérivé	0.23	9.2	90
8	uréase	0.19	7.3	71
	dérivé		7.7	75

(Pour les courbes $r = f(\text{pH})$ voir partie théorique).

Colonnes d'uréase insoluble.

Dans une colonne en verre, thermostatée à 30°, on dis-

pose entre deux couches minces de sable de Fontainebleau une couche de 60 mg de dérivé insoluble uréase/vanacryl mélangé à 3.5 g de célite, et on fait percoler une solution d'urée à 2 g/l (tampon phosphate 0.02 M à pH 7.5).

Pour mesurer l'activité de la colonne (dont le débit n'est pas constant) on collecte la solution qui s'écoule en 10 min. Puis on prend 1 cm³ de cette solution, auquel on ajoute 9 cm³ de solution A (ce qui donne 10 cm³ de solution B). On dose ensuite selon la méthode habituelle et on obtient ainsi la masse M d'enzyme produisant la même absorption que 1 cm³ de solution. Pour trouver la masse d'enzyme ayant la même activité que la colonne, on multiplie la valeur ci-dessus par le volume écoulé en 10 min (débit).

Temps (h)	Débit (cm ³ /10 min)	Absorbance	Masse d'uréase M (mg)	Débit × Masse M	r (%)
6	2.6	0.25	10.2	26.5	100
18	2.6	0.20	7.8	20.3	76
24	2.6	0.20	7.8	20.3	76
48	1.8	0.15	5.3	9.5	36
72	1.8	0.12	3.8	6.8	26
96	1.6	0.095	2.5	4	15
120	1.6	0.08	1.8	2.9	11
144	1.5	0.07	1.3	1.95	7
168	1.5	0.06	0.8	1.2	5

(Pour la courbe $r = f(t)$, voir partie théorique)

On a dosé à nouveau les premiers éluats obtenus après les avoir conservés 24 h à 4° et on a trouvé les mêmes valeurs qu'au départ: il n'y a donc pas eu de passage de l'uréase fixée dans l'éluat.

Dans une seconde colonne identique à la première, on dispose une couche de 100 mg de dérivé insoluble obtenu à partir de Covanacryl-5 mélangé à 3.5 g de célite au travers de laquelle on fait percoler pendant 3 jours de suite une solution d'urée à 0.5 g/l (tampon phosphate 0.02 M à pH 7.5) et maintenue à 30°. Par dosage de l'éluat on constate que l'urée en solution est intégralement transformée en carbonate d'ammonium.

Le débit moyen étant sensiblement de 12 cm³/h, la colonne permet la transformation de 1 mM d'urée/h et par gramme de dérivé insoluble.

Activité en fonction du temps de stockage

On a mesuré selon la méthode habituelle l'activité enzymatique d'un dérivé insoluble d'uréase, obtenu à partir de Vanacryl, et conservé en suspension dans l'eau distillée à 4°. On trouve ainsi la masse M d'uréase soluble ayant la même activité que le dérivé. Si on appelle r le pourcentage d'activité du dérivé par rapport à l'activité originelle, on a $r = 0$ au temps $t = 0$. La courbe $r = f(t)$ a été donnée en partie théorique.

Remerciements—Nous remercions Monsieur Eric Sélégné pour ses conseils et ses encouragements.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹E. Riesel et E. Katchalski, *J. Biol. Chem.* **239**, 1521 (1964)
²E. Katchalski et A. Bar-Eli, *Brevet Britannique* no 916 931 (1963); *Chem. Abstr.* **58**, 11 618 h (1963)

- ³E. Katchalski et A. Bar-Eli, *Brevet Israélien* no 13 950, (1960); *Chem. Abstr.* **56**, 7 702 h (1962)
- ⁴E. Brown, A. Racois et H. Gueniffey, *Tetrahedron Letters* 2139 (1970)
- ⁵E. Brown et A. Racois, *Bull. Soc. Chim.* 4351 (1971)
- ⁶M. Kitajima et S. Miyano, *Kogyo Kagaku Zasshi*, 1969, **72**, 493; *Chem. Abstr.* **70**, 118 067 a (1969)
- ⁷*Chem. Eng. News*, 15 février 1971, p. 86
- ⁸E. Brown et A. Racois, travaux à paraître
- ⁹I. H. Silman et E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.* **35**, part. II, 873 (1966)
- ¹⁰H. R. Manler et E. H. Cordes, *Biological Chemistry*, Harper & Row, London, 1967, 278
- ¹¹E. S. West, W. R. Todd, H. S. Mason et J. J. Van Bruggen, *A textbook of Biochemistry*, McMillan, London, 1970, 326
- ¹²A. S. Lindsey, *Revs. Macromol. Chem. C*, **3**(1), 1, (1969)
- ¹³Réf 10, p. 12
- ¹⁴Y. Tiffon, J. P. Pujol et P. Lubet, *Trav. Prat. de Biologie des Animaux*, Faculté des Sciences, Caen
- ¹⁵H. Brandenberger, *Rev. Ferment. Ind. Aliment.* **11**, 237 (1956)