

UN MODÈLE DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.  
PROPRIÉTÉS DU BENZOYLPHOSPHATE DE PHÉNYLE

par

H. CHANTRENNE\*

*Laboratoires de Morphologie animale et de Physiologie cellulaire, Faculté des Sciences,  
Université de Bruxelles (Belgique)*

I. INTRODUCTION

Au cours de recherches antérieures<sup>1, 2</sup> nous avons observé que le dibenzoylphosphate résiste beaucoup mieux à l'hydrolyse que le monobenzoylphosphate, et que l'une de ses fonctions anhydride réagit très rapidement à 37° avec le groupe NH<sub>2</sub> des acides α-aminés en solution aqueuse à pH 7.4 alors que le monobenzoylphosphate est inerte dans les mêmes conditions.

En engageant le groupe phosphorique du benzoylphosphate dans une seconde liaison anhydride, on protège donc l'autre liaison anhydride contre l'hydrolyse, et on l'active vis-à-vis des amines primaires.

Les expériences décrites ci-dessous ont été entreprises dans le but de connaître l'influence d'un substituant d'un autre type — un phénol — sur les propriétés de la liaison anhydride du benzoylphosphate.

II. SYNTHÈSE DU BENZOYLPHOSPHATE DE PHÉNYLE

Nous avons obtenu du benzoylphosphate de phényle en faisant agir du chlorure de benzoyle sur le sel d'argent du phosphate de phényle.

*Préparation du sel d'argent du phosphate de phényle*

Le phosphate de phényle a été préparé selon FREEMAN ET COLVER<sup>3</sup>; on en a isolé le sel disodique, qui a été purifié par recristallisation dans l'eau-alcool.

A une solution de 21.8 g de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> (= 0.1 molg) dans 300 ml d'eau, on a ajouté une solution de 35 g de nitrate d'argent (= 0.22 molg) dans 150 ml d'eau. Le précipité microcristallin a été lavé à l'eau froide, à l'alcool, à l'éther, puis séché dans le vide en présence d'acide sulfurique, à l'abri de la lumière. Le produit obtenu est beige clair.

On a dosé l'argent par la méthode classique de VOLHARD, et le phosphore par la méthode de KÜTTNER ET LIECHTENSTEIN<sup>13</sup>.

Trouvé	7.95% P	56.5% Ag
Valeurs théoriques pour C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> PO <sub>4</sub> Ag <sub>2</sub>	7.96% P	55.7% Ag

*Benzoylphosphate de phényle*

Toutes les opérations qui suivent s'effectuent en chambre froide (+ 2°) à l'aide de matériel et de produits froids.

Dans un flacon sec, on introduit 8 g de sel d'argent du phosphate de phényle

\* "Chargé de Recherches" du Fonds National de la Recherche Scientifique.

$C_6H_5PO_4Ag_2$ , 50 ml d'éther, et quelques billes de verre. On y ajoute un mélange de 8 ml de chlorure de benzoyle et 50 ml d'éther. On agite vigoureusement le flacon pendant une demi-heure. La réaction se déclanche après quelques minutes: le mélange s'échauffe légèrement et devient pâteux, puis le chlorure d'argent formé s'agglomère et se sépare; on élimine les sels d'argent par centrifugation, on les lave deux fois à l'éther et on rassemble les solutions éthérrées qui contiennent du chlorure de benzoyle, de l'acide benzoïque, un peu de phosphate de phényle et du benzoylphosphate de phényle.

#### *Isolement du sel d'argent du benzoylphosphate de phényle*

On verse la solution éthérrée dans une ampoule à décanter; on y ajoute 1/4 de son volume d'eau glacée et une goutte de solution de vert de bromocrésol. On amène le  $p_H$  à 4.5 par addition d'une solution de NaOH à 20%, et on laisse 15 minutes à la glacière en agitant de temps en temps et en maintenant le  $p_H$  à 4.5.

On sépare alors la couche aqueuse, on y ajoute de l'acide nitrique 5 N pour amener le  $p_H$  en dessous de 4 (couleur orange de l'indicateur). On extrait 3 fois à l'éther en ramenant éventuellement le  $p_H$  en dessous de 4 après chaque extraction; le gros de l'acide benzoïque est ainsi éliminé.

On dose les ions chlore présents, sur 1 ml de solution (méthode de VOLHARD) et on ajoute un peu plus de la quantité calculée d'une solution à 5% de nitrate d'argent. On élimine le précipité de chlorure d'argent par centrifugation, on ajuste le  $p_H$  à 7 et on ajoute quelques gouttes d'une solution à 25% de nitrate d'argent, en agitant; si la solution contient du phosphate de phényle, son sel d'argent précipite immédiatement à l'état amorphe ou en très petits cristaux, qu'on élimine. Lorsque l'addition d'une goutte de solution à 25% de nitrate d'argent ne cause plus de précipitation, on ajoute un volume de solution à 25% de nitrate d'argent égal au dixième du volume de la solution traitée. De longues aiguilles incolores apparaissent peu à peu; on laisse la solution dans la chambre froide pendant deux heures; on agite de temps en temps et on réajuste le  $p_H$  qui s'abaisse au cours de la cristallisation. (Utiliser à cette fin de la soude très diluée, et agiter vigoureusement pour éviter la précipitation d'oxyde d'argent.) On essore les cristaux sur un filtre de Büchner, on les lave avec le moins possible d'eau glacée, et on les sèche dans le vide en présence d'acide sulfurique.

	Trouvé	8.00 % P	28.4 % Ag
Valeurs théoriques pour $C_6H_5COPO_4AgC_6H_5$	8.05 % P	28.04 % Ag	

#### *Isolement du sel de sodium du benzoylphosphate de phényle*

Après la réaction de  $C_6H_5PO_4Ag_2$  avec le chlorure de benzoyle, au lieu d'extraire la solution éthérrée par l'eau, on y ajoute deux volumes d'éther de pétrole. Le liquide se sépare en deux phases. On recueille la plus dense, on la lave avec un peu d'éther de pétrole, puis on y ajoute 2 ml d'eau glacée et une goutte d'une solution de vert de bromocrésol; on ajoute ensuite goutte à goutte une solution à 20% de NaOH jusqu'au virage au vert de l'indicateur. De longues aiguilles cristallines se séparent bientôt; on les essore à froid sur un filtre de Büchner et on les lave à l'éther. Pour les recristalliser, on les dissout dans le moins possible d'eau à 45-50°, puis on refroidit la solution à 0°.

	Trouvé	10.1 % P
Valeur théorique pour $C_6H_5COPO_4NaC_6H_5$	10.33 % P	

## III. PROPRIÉTÉS DU BENZOYLPHOSPHATE DE PHÉNYLE

## 1. Réaction avec l'hydroxylamine

Comme les autres acylphosphates, le benzoylphosphate de phényle réagit avec l'hydroxylamine en formant un acide hydroxamique (acide benzhydroxamique) décelable par la formation d'un complexe rouge avec les ions ferriques en milieu acide fort.

LIPMANN ET TUTTLE<sup>4</sup> ont utilisé cette réaction pour le dosage de l'acétylphosphate; nous l'avons employée pour doser le benzoylphosphate et le dibenzoylphosphate<sup>2</sup>. Elle permet aussi de doser le benzoylphosphate de phényle.

L'expérience suivante montre que la réaction du benzoylphosphate de phényle avec l'hydroxylamine N à  $p_H$  7.4 peut être considérée comme complète après 45 minutes d'incubation à 37°.

*Expérience*

On a mis en suspension dans 6 ml de tampon de phosphate M/30  $p_H$  7.4 contenant du chlorure de sodium (M/50) 23 mg de sel d'argent du benzoylphosphate de phényle; on a éliminé le chlorure d'argent par centrifugation.

On a placé dans un thermostat à 37° 5 ml du liquide surnageant, puis on y a ajouté 5 ml d'une solution 2 N d'hydroxylamine  $p_H$  7.4. Après des durées d'incubation bien déterminées, on a prélevé des échantillons de 1 ml du liquide, et on les a mélangés chaque fois à 1 ml d'une solution à 1.66% de  $FeCl_3$  dans HCl normal. Les solutions rouges obtenues ont été diluées par addition de 2 ml de  $FeCl_3$  0.83% dans HCl 0.5 N. On a déterminé l'intensité de la coloration rouge à l'aide d'un photomètre Spekker (filtre vert H 455-O.G.R.) cuvette de 5 mm.

Durée d'incubation	Extinction Iuc
5 minutes	0.288
10 "	0.390
20 "	0.461
30 "	0.475
45 "	0.481
70 "	0.481

## 2. Vitesse d'hydrolyse

La demi-durée de vie du monobenzoylphosphate à 37° en solution aqueuse  $p_H$  7.4 est d'environ 4 heures 40 minutes; celle du dibenzoylphosphate, de 45 heures<sup>1, 2</sup>. Le benzoylphosphate de phényle est encore plus stable: après 6 heures d'incubation à 37° dans un tampon de phosphate  $p_H$  7.4 la teneur en groupes anhydride d'une solution M/100 de benzoylphosphate de phényle n'accusait pas de diminution mesurable par la méthode à l'hydroxylamine. Après 26 heures à  $p_H$  7.4 et 37° (en présence d'un peu de toluène utilisé comme antiseptique) la concentration avait décrue de moins de 4%.

La liaison anhydride du benzoylphosphate de phényle résiste donc beaucoup mieux à l'hydrolyse que celle du benzoylphosphate.

## 3. Réaction du benzoylphosphate de phényle avec le glycocolle

Nous venons de voir qu'à 37° en solution aqueuse de  $p_H$  7.4 le benzoylphosphate de phényle est très stable. Si on ajoute du glycocolle à la solution sans modifier le  $p_H$ , on observe la disparition rapide de la liaison anhydride:

*Expérience*

On plonge dans un thermostat réglé à 37° deux tubes à essais contenant les mélanges suivants:  
A. 5 ml solution de benzoylphosphate de phényle M/50 dans un tampon de phosphate M/15  $p_H$  7.4  
+ 5 ml tampon de phosphate M/15  $p_H$  7.4.

B. 5 ml de la même solution de benzoylphosphate de phényle  
+ 5 ml solution de glycocolle M/5 dans un tampon de phosphate M/15  $p_H$  7.4.

Après des durées d'incubation bien déterminées, on prélève 1 ml de chacun des mélanges et on l'ajoute à 1 ml d'une solution normale d'hydroxylamine ( $p_H$  7). On laisse à  $37^\circ$  pendant 45 min, puis on ajoute 2 ml d'une solution de  $FeCl_3$  à 1.66% dans HCl normal. La coloration rouge violette de l'hydroxamate ferrique apparaît immédiatement; on détermine l'intensité de cette coloration à l'aide d'un photomètre Spekker (filtre vert H. 455-O.G.R.).

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus:

A		B	
Durée d'incubation	Groupes anhydride restant	Durée d'incubation	Groupes anhydride restant
0 min	100%	0 min	100 %
60 ..	100%	10 ..	84.3%
360 ..	100%	20 ..	74.2%
		30 ..	63.9%
		60 ..	45.2%
		90 ..	34.1%
		120 ..	26.9%
		180 ..	16.4%
		330 ..	6.3 %

Dans les conditions expérimentales adoptées, la moitié du benzoylphosphate de phényle disparaît en 50 min.

#### 4. Formation d'acide hippurique dans cette réaction

##### Expérience

Dans 30 ml de tampon de phosphate M/15  $p_H$  7.4 contenant 80 mg de NaCl, on a mis en suspension 250 mg de sel d'argent du benzoylphosphate de phényle; on a éliminé le chlorure d'argent formé, par centrifugation. Dans la solution de benzoylphosphate de phényle ainsi préparée, on a dissous 225 mg de glycocolle. La solution a été mise dans un thermostat réglé à  $37^\circ$ . On a suivi les progrès de la réaction par dosage des groupes anhydride.

Après 6 heures, 99% des groupes anhydride avaient disparu. On a ajouté deux gouttes de bleu de thymol, puis de l'acide sulfurique 10 N jusqu'à virage au rouge de l'indicateur. On a extrait 10 fois à l'éther, en utilisant 30 ml d'éther pour chaque extraction. La solution éthérée a été séchée sur sulfate de sodium. L'éther, chassé par distillation, a laissé un résidu blanc cristallin. On a recristallisé deux fois ce produit dans l'eau. Les cristaux obtenus donnent une solution acide, leur forme est celle des cristaux d'acide hippurique. Ils fondent à 186.5-187°, exactement en même temps qu'un échantillon d'acide hippurique, et qu'un mélange de quantités égales de ces cristaux et d'acide hippurique authentique.

Nous pouvons donc conclure que le benzoylphosphate de phényle réagit avec le glycocolle en solution aqueuse à  $p_H$  7.4 en formant de l'acide hippurique.

Le tampon de phosphate n'est pas nécessaire à la réaction du glycocolle avec le benzoylphosphate de phényle: celle-ci se produit aussi bien dans un tampon de véronal M/20  $p_H$  7.4.

A  $p_H$  4.6, dans un tampon d'acétate, le benzoylphosphate de phényle s'hydrolyse lentement; il est presque aussi stable qu'à  $p_H$  7.4. A  $p_H$  4.6, le glycocolle M/10 ne réagit que très lentement avec le benzoylphosphate de phényle M/100: moins de 4% des liaisons anhydride disparaissent en 4 heures à  $38^\circ$ .

#### 5. Réaction avec l'ammoniaque

Dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites au § 3 à cela près que le glycocolle était remplacé par du chlorure d'ammonium à la même concentration moléculaire, on a observé également une rapide disparition des liaisons anhydride.

L'ammoniaque réagit donc avec le benzoylphosphate de phényle à peu près à la même vitesse que le glycocolle, dans les mêmes conditions de  $p_H$  et de concentration.

Durée d'incubation	Groupes anhydride restant
0 min	100 %
15 "	86.6 %
30 "	76.7 %
45 "	67.9 %
75 "	56.9 %
120 "	44.2 %
180 "	31.7 %
255 "	24.8 %

### 6. Réaction avec les amines aromatiques

Dans des conditions identiques de concentration,  $p_H$  et température, l'aniline ou l'acide p-aminobenzoïque réagissent beaucoup plus lentement que le glycocolle ou l'ammoniaque avec le benzoylphosphate de phényle; les chiffres suivants en font foi:

Aniline	
Durée d'incubation	Groupes anhydride restant
0 min	100 %
15 "	96.6 %
30 "	95.6 %
45 "	94.4 %
75 "	93.2 %
120 "	89.6 %
180 "	84.4 %
255 "	82.2 %

A  $p_H$  4.6, la réaction avec l'aniline se produit aussi, et à une vitesse comparable (concentration réduite à 85% en 4 heures).

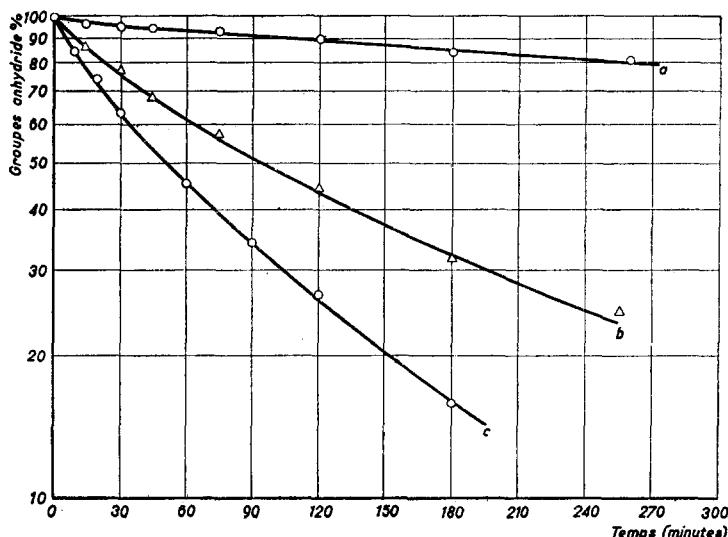


Fig. 1. Réaction du benzoylphosphate de phényle avec les amines; température: 37°; tampon de phosphate  $\frac{M}{15}$  PH 7.4 concentrations: benzoylphosphate de phényle:  $\frac{M}{100}$  amines:  $\frac{M}{10}$ .  
 a: aniline                    b: ammoniaque                    c: glycocolle

## IV. ACTION DE L'ACYLPHOSPHATASE SUR DES BENZOYLPHOSPHATES SUBSTITUÉS

LIPMANN ET TUTTLE<sup>5</sup>, SHAPIRO ET WERTHEIMER<sup>6</sup>, LEHNINGER<sup>7</sup> ont signalé l'existence dans les tissus animaux d'un enzyme différent des phosphatases banales, et qui hydrolyse les acylphosphates. Nous avons noté dans une publication antérieure<sup>2</sup> que cet enzyme — ou un enzyme du même type — attaque rapidement le monobenzoylphosphate.

Nous avons soumis du monobenzoylphosphate, du dibenzoylphosphate et du benzoylphosphate de phényle à une même préparation d'acylphosphatase dans des conditions identiques, afin de comparer l'activité de l'enzyme sur ces trois composés voisins.

*Expérience*

**Enzyme :** On a mis en suspension dans 10 ml de tampon de véronal M/10 pH 7.4 250 mg de poudre acétone de foie de rat. Après une heure de contact à la température du laboratoire (21°) la suspension a été centrifugée 10 minutes à 3000 t/min.

On a utilisé dans l'expérience décrite ci-dessous le liquide surnageant clair, qui avait séjourné une nuit dans la chambre froide (+ 2°).

On a placé dans un thermostat réglé à 37° trois tubes à essais contenant les solutions suivantes:

A. 4.5 ml de benzoylphosphate 0.0045 M dans un tampon de véronal M/10 pH 7.4

B. 4.5 ml de dibenzoylphosphate 0.0023 M dans le même tampon

C. 4.5 ml de benzoylphosphate de phényle 0.0045 M dans le même tampon.

On a ajouté à chacune des solutions 1 ml de la solution d'enzyme. Après des temps d'incubation déterminés, on a prélevé 1 ml de chacune de ces solutions, et on a mélangé chacune des prises d'essai à 1 ml d'hydroxylamine 2 N pH 7. Après 45 min d'incubation à 37°, on a ajouté à chacun de ces mélanges 2 ml d'une solution de 1.66 g FeCl<sub>3</sub> et 4 g d'acide trichloracétique dans 100 ml d'acide chlorhydrique normal. Les protéines sont précipitées, et la coloration rouge d'hydroxamate ferrique se développe aussitôt; après 30 min de séjour à 0°, le précipité de protéines a été éliminé par centrifugation, et l'intensité de la coloration rouge déterminée à l'aide d'un photomètre Spekker (filtre vert O.G.R.).

Les résultats de cette expérience ont été rassemblés dans la Fig. 2 qui représente la

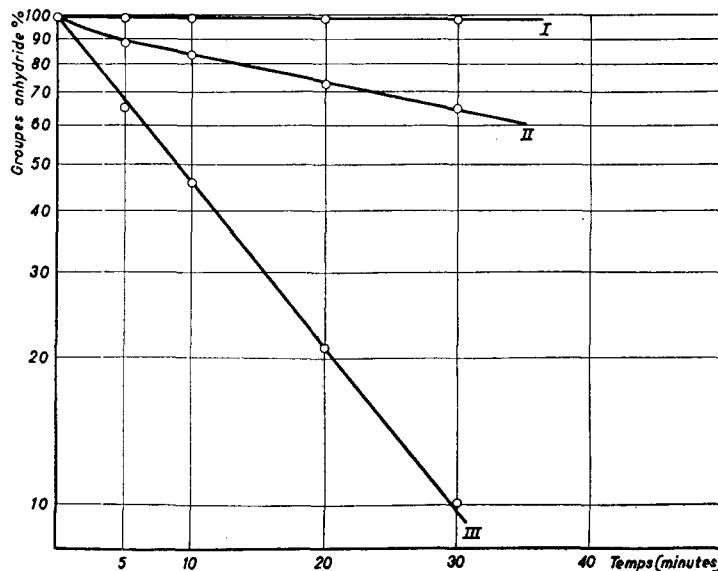


Fig. 2. Action d'un même extrait de poudre acétone de foie de rat sur: I. Le benzoylphosphate de phényle. II. Le dibenzoylphosphate. III. Le benzoylphosphate. Température: 37°; tampon de véronal  $\frac{M}{10}$  pH 7.4; concentration des groupes anhydride au temps zéro: 0.0036 M.

variation de la teneur en groupes anhydride au cours du temps en présence de l'enzyme, et pour chacun des substrats.

Cette figure montre clairement que le dibenzoylphosphate et surtout le benzoylphosphate de phényle sont beaucoup moins vite hydrolysés que le monobenzoylphosphate en présence d'un extrait de poudre acétonique de foie de rat.

#### V. DISCUSSION. CONCLUSIONS

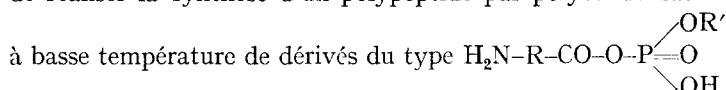
L'estérification de l'un des groupes acides du benzoylphosphate par le phénol a pour effet de protéger la liaison anhydride contre l'hydrolyse et de l'activer vis-à-vis des amines primaires aliphatiques et de l'ammoniaque. Cet effet est qualitativement semblable à celui qu'on observe lorsqu'on engage le groupe phosphorique du benzoylphosphate dans une seconde liaison anhydride<sup>2</sup>. Le benzoylphosphate de phényle est encore moins sensible à l'hydrolyse que le dibenzoylphosphate; il réagit aussi un peu moins vite que ce dernier avec les amines.

Les travaux de LIPMANN<sup>8</sup>, P. P. COHEN ET MC. GILVERY<sup>9</sup>, BORSOOK ET DUBNOFF<sup>10</sup>, SPECK<sup>11</sup>, ELLIOTT<sup>12</sup> montrent que la formation de la liaison peptidique au cours de la synthèse de l'acétylsulfanilamide, de l'acide p-aminohippurique, de l'acide hippurique, de la glutamine, requiert l'intervention de l'acide adénosinetriphosphorique; cela suggère qu'il se forme, aux dépens de l'A.T.P., des dérivés phosphorylés intermédiaires à potentiel chimique élevé, peut-être du type des acylphosphates.

La formation d'acide hippurique *in vitro* à partir de glycocolle et de dibenzoylphosphate<sup>1, 2</sup> ou de benzoylphosphate de phényle constitue un modèle de formation d'une liaison peptidique à partir d'amines et de dérivés d'acylphosphates, dans les conditions „physiologiques“ de pH et de température. Ce modèle pourrait, croyons-nous, jeter quelque lumière sur le mode de formation des liaisons peptidiques dans la cellule vivante, et en particulier sur le mécanisme intime du „couplage“ de cette synthèse avec les cycles de la phosphorylation dispensateurs d'énergie.

Il est permis d'imaginer par exemple que les carboxyles des acides aminés ou de leurs précurseurs immédiats s'activeraient au niveau de groupes phosphoriques liés d'autre part à quelque constituant cellulaire — coferment phosphorylé, acide nucléique — et deviendraient ainsi capables de réagir avec les groupes amine d'autres acides aminés.

D'un point de vue purement chimique, la réaction observée indique la possibilité de réaliser la synthèse d'un polypeptide par polycondensation en solution aqueuse et



#### RÉSUMÉ

Synthèse de benzoylphosphate de phényle; isolement de ses sels de sodium et d'argent cristallisés. Le benzoylphosphate de phényle est très stable à 37° en solution aqueuse à pH 7.4.

Il réagit rapidement avec le glycocolle en solution aqueuse à pH 7.4 et 37°, en formant de l'acide hippurique. Une liaison peptidique se forme donc spontanément dans les conditions „physiologiques“ de température et de pH, dans une réaction qui met en jeu un acide aminé et un dérivé d'acylphosphate.

Le benzoylphosphate de phényle réagit également avec l'ammoniaque et, beaucoup plus lentement, avec les amines aromatiques.

Le dibenzoylphosphate et le benzoylphosphate de phényle sont beaucoup moins vite hydrolysés que le monobenzoylphosphate en présence d'extraits de tissus contenant l'acylphosphatase.

Brève discussion de ces résultats et de leur signification, notamment en ce qui concerne le mécanisme de la formation des liaisons peptidiques.

### SUMMARY

Phenyl benzoylphosphoric acid has been synthesized; its crystalline sodium and silver salts have been isolated.

Phenyl benzoylphosphate is very stable at 37° in aqueous solution of pH 7.4.

It reacts readily at 37° with glycine in aqueous solution (pH 7.4) forming hippuric acid. A peptide linkage thus spontaneously forms under "physiological" conditions of pH and temperature, in a reaction involving an aminoacid and an acylphosphate derivative.

Phenyl benzoylphosphate also reacts with ammonia and, much more slowly, with aromatic amines.

Dibenzoylphosphate and phenyl benzoylphosphate are much less readily hydrolysed than monobenzoylphosphate in presence of tissue extracts containing acylphosphatase.

These results are discussed with special reference to their possible significance for the understanding of the mechanism of peptide linkage formation.

### ZUSAMMENFASSUNG

Phenylbenzoylphosphorsäure wurde synthetisiert; ihre kristallisierte Natrium- und Silbersalze wurden isoliert.

Phenylbenzoylphosphat ist bei 37° in wässriger Lösung von pH 7.4 sehr stabil.

Es reagiert bei 37° schnell mit Glykokoll in wässriger Lösung (pH 7.4), wobei Hippursäure gebildet wird. Eine Peptidbindung entsteht also spontan unter "physiologischen" Bedingungen von pH und Temperatur bei einer Reaktion zwischen einer Aminosäure und einem Derivat eines Acylphosphats.

Phenylbenzoylphosphat reagiert auch mit Ammoniak und ebenfalls, aber viel langsamer, mit aromatischen Aminen.

Dibenzoylphosphat und Phenylbenzoylphosphat werden bei Anwesenheit von Gewebeextrakten, die Acylphosphatase enthalten, viel weniger schnell hydrolysiert als Monobenzoylphosphat.

Diese Ergebnisse werden unter besondere Berücksichtigung ihrer eventuelle Bedeutung für den Mechanismus der Bildung der Peptidbindung diskutiert.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. CHANTRENNE, *Nature*, 160 (1947) 603.
- <sup>2</sup> H. CHANTRENNE, *C. R. Lab. Carlsberg*, 26 (1948) 297.
- <sup>3</sup> H. F. FREEMAN ET C. W. COLVER, *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (1938) 750.
- <sup>4</sup> F. LIPMANN ET C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 21.
- <sup>5</sup> F. LIPMANN ET C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 571.
- <sup>6</sup> B. SHAPIRO ET E. WERTHEIMER, *Nature*, 156 (1945) 690.
- <sup>7</sup> A. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 162 (1946) 333.
- <sup>8</sup> F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 173.
- <sup>9</sup> P. P. COHEN ET MC GILVERY, *J. Biol. Chem.*, 169 (1947) 119; *ibid.*, 171 (1947) 121.
- <sup>10</sup> H. BORSOOK ET J. W. DUBNOFF, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 397.
- <sup>11</sup> J. F. SPECK, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 403.
- <sup>12</sup> W. H. ELLIOT, *Nature*, 161 (1948) 128.
- <sup>13</sup> T. KÜTTNER ET L. LIECHTENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 86 (1930) 671.

Received April 13th, 1948