

BBA 46653

## INFLUENCE DU pH SUR LA SYNTHÈSE DE L'OXIDASE (CYTOCHROME $a_3$ ) CHEZ *BACILLUS COAGULANS*, MICROORGANISME THERMOPHILE, CAPABLE D'“ADAPTATION RESPIRATOIRE”

RAYMOND FRADE et PAULETTE CHAIX

*Laboratoire de Chimie Biologique, Université Paris VI, 96, Bd Raspail, 75006 Paris, (France)*

(Reçu le 29 juin, 1973)

### SUMMARY

In a new series of experiments on *Bacillus coagulans* (ATCC 11.369), it was demonstrated that this organism possesses a respiratory system with cytochromes  $b$ ,  $c_1$ ,  $c$ ,  $(a+a_3)$  and also cytochrome  $o$ . A small decrease in the pH of the growth medium from 6.5 to 5.5 increases the respiratory activity by a factor of 4 and induces a variation of the absorption ratio  $[\alpha_{603}(a+a_3)]/[\alpha_{560}(b+c)]$  resulting in a preponderant increase in the  $\alpha_{603}$  absorption. The kinetic studies of the respiratory system synthesis during the phenomenon of “respiratory adaptation” have shown that lowering the pH of the adaption medium has the same effect. Spectral studies of membrane fractions (red dithionite) with or without carbon monoxide showed a preferential synthesis of oxidase  $a_3$ .

### RÉSUMÉ

Cette nouvelle série de recherches sur *Bacillus coagulans* (ATCC 11 369) a permis de montrer qu'il possède un système respiratoire comprenant les cytochromes  $b$ ,  $c_1$ ,  $c$ ,  $(a+a_3)$  et aussi le cytochrome  $o$ . Un faible abaissement du pH du milieu de culture, de 6,5 à 5,5, entraîne une augmentation de 4 fois de l'activité respiratoire et un accroissement du rapport d'absorption  $\alpha_{603}(a+a_3)/\alpha_{560}(b+c)$  dépendant principalement de l'augmentation de  $\alpha_{603}$ . Des essais d'“adaptation respiratoire” ont permis de suivre la cinétique de synthèse du système respiratoire et de constater que l'abaissement du pH du milieu d'“adaptation respiratoire” exerce le même effet. L'étude spectrale des fractions membranaires (réduites par dithionite) en présence ou non d'oxyde de carbone permet de constater que c'est essentiellement l'accroissement de la synthèse de l'oxydase  $a_3$  qui est en cause.

### INTRODUCTION

Chaix et Flamens<sup>1-3</sup> ont montré que *B. coagulans* (ATCC 11 369), bacille thermophile homolactique, est susceptible de croître indifféremment en anaérobiose stricte ou en aérobiose et, dans ce dernier cas seulement, d'être pourvu d'un système

respiratoire paraissant ne comporter que deux composantes cytochromiques.

Le présent travail a eu tout d'abord pour objet de préciser à l'aide de techniques spectrophotométriques plus fines que celles précédemment utilisées, la nature des différentes composantes hématiniques du système respiratoire de *B. coagulans*, cultivé en aérobiose. Il a conduit à mettre en évidence que des variations relativement faibles du pH (6,5 à 5,5) du milieu de culture ou du milieu d'"adaptation respiratoire"<sup>4</sup> influencent la synthèse du système cytochromique et, d'une façon prépondérante, la synthèse de l'oxydase (cytochrome  $a_3$ ).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Souche utilisée: Bacillus coagulans* (ATCC 11 369)<sup>3</sup>.

*Composition des milieux*

*de conservation des souches:* milieu gélosé incliné glucose 2 ‰, extrait de levure 1 ‰; peptone pancréatique exempte d'indole 0.1 ‰;  $\text{CaCO}_3$  2 ‰; agar-agar 4 ‰.

*des précultures:* milieu liquide II décrit par Chaix et Flamens<sup>1</sup>.

*des cultures aérobies ou anaérobies:* glucose 5 ‰; extrait de levure 1 ‰, peptone 0.25 ‰; phosphate de potassium 0.1 ‰; sulfate d'ammonium 0.12 ‰. Ce milieu est tamponné soit par du  $\text{CaCO}_3$  2.5 ‰, soit par neutralisation continue à 0.1 pH près, par pH stat à l'aide de KOH 2 M.

*Conditions de préculture et de culture*

Les précultures (volume liquide 400 ml) sont ensemencées à partir d'une culture sur gélose fraîchement repiquée et incubées à 50 °C pendant 15 h.

Les cultures aérobies ou anaérobies sont effectuées dans un fermenteur de type voisin de celui décrit<sup>5</sup> contenant 20 litres de milieu (température 50 °C). Le taux de croissance est déterminé par mesure néphélométrique à 500 nm (photomètre Coleman Junior). Si le milieu contient  $\text{CaCO}_3$ , il est nécessaire de l'éliminer par une centrifugation rapide (2 min à 1000 g).

*Les récoltes bactériennes*

Les récoltes bactériennes sont toujours faites en phase exponentielle de croissance ( $A$  0.7) par sédimentation (5 min à 10 000  $\times g$ ) (centrifugeuse Christ Zeta 17). La température ne doit pas s'abaisser au-dessous de 20 °C car *B. coagulans*, cultivé à 50 °C, se lyse sous l'effet d'un abaissement trop important de la température. Lors de cultures anaérobies, la récolte est faite sous courant d'Azote U.

*Fractionnement cellulaire, préparation des membranes bactériennes*

*B. coagulans* (Gram +) étant sensible au lysozyme, les membranes totales sont séparées d'après la méthode décrite par Ferrandes<sup>6</sup>. Ces membranes totales sont mise en suspension dans une quantité de tampon phosphate 0.1 M, pH 7, suffisante pour obtenir une préparation correspondant à 4 à 6 mg de protéines par ml.

*Etude spectrophotométrique des cytochromes*

Etude spectrophotométrique à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (Lérès Spila DMS).

(1) *Spectres à température ordinaire* (a) *des bacilles entiers:* méthode de Labbe et al.<sup>7</sup>; (b) *des suspensions membranaires:* méthode des spectres de différence<sup>8</sup>: la concentration en cytochromes correspondant aux bandes d'absorption situées à 603 nm (cytochromes  $a+a_3$ ) et 560 nm (cytochromes  $b$ ,  $c_1$  et  $c$ ) est estimée en unités d'absorbance par mg de protéines. Les spectres des dérivés oxycarbonés sont réalisés

sur les préparations membranaires d'après la méthode de Chance<sup>9</sup> et L. Smith<sup>10,27</sup>

(2) *Les spectres à basse température* (Azote liquide  $-190^{\circ}\text{C}$ ) n'ont été effectués que sur les culots de membranes totales d'après la technique de Labbe et Chaix<sup>11</sup>.

*Les vitesses de consommation d'oxygène dissous*

Les vitesses de consommation d'oxygène dissous sont déterminées à l'aide d'une électrode de Clark (oxygraph Gilson). Elles sont exprimées en  $Q_{O_2} = \mu\text{l}/\text{mg}$  protéine par h.

(1) *Mesure du  $Q_{O_2}$  des bacilles.* Elle est faite à  $50^{\circ}\text{C}$  sur un échantillon de 0.5 ml prélevé dans la culture additionnée de: 3.5 ml de tampon 0.1 M, pH 7 (volume final 4 ml). Une addition de substrat est inutile car, à ce stade, le milieu contient encore du glucose

(2) *Mesure de  $Q_{O_2}$  des fractions membranaires ( $30^{\circ}\text{C}$ ).* Chaque essai d'un volume total de 4 ml contient dans du tampon phosphate 0.1 M, pH 7, 1 mg de protéines membranaires et NADH 1 mM.

*Dosage des protéines bactériennes*

Dosage des protéines bactériennes après lyse totale des bacilles en milieu hypotonique en présence de lysozyme, par la méthode de Lowry *et al.*<sup>12</sup>.

## RÉSULTATS

### *Caractères spectraux de *B. coagulans* cultivé en aérobiose*

Les enregistrements spectraux, à température ordinaire, obtenus avec des bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance ( $A\ 0.7$ ) présentent, à l'état réduit (dithionite), 2 bandes  $\alpha$  asymétriques à 603 nm et 560 nm (Fig. 1).

Le spectre absolu des membranes totales à l'état réduit (dithionite) à basse température (Fig. 2) montre: à 602 nm, un pic occupant la même position que les bandes  $\alpha$  des cytochromes  $a+a_3$ ; à 562 nm, un épaulement attribuable à la bande  $\alpha$  du cytochrome  $b$ ; à 554 nm, un pic attribuable à la bande  $\alpha$  du cytochrome  $c_1$ ; à 548 nm, un épaulement attribuable à la bande  $\alpha$  du cytochrome  $c^{13}$ ; en deçà de 540 nm, le spectre est attribuable aux bandes  $\beta$ . L'épaulement situé à 585 nm dépend probablement de la présence de Zn-protoporphyrine<sup>14</sup>. Dans la zone des bandes Soret, il y a,

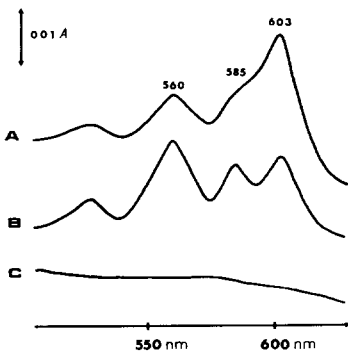


Fig. 1. Spectre absolu à température ordinaire (réduction par le dithionite) de *B. coagulans* récolté en phase exponentielle de croissance ( $A\ 0.7$ ) sur milieu liquide complexe glucosé. A en aérobiose, milieu neutralisé par  $\text{CaCO}_3$  ou par pH stat à pH 5.5, B: en aérobiose, milieu neutralisé par pH stat à pH 6.5, C. en anaérobiose (pH 5.5 ou 6.5)

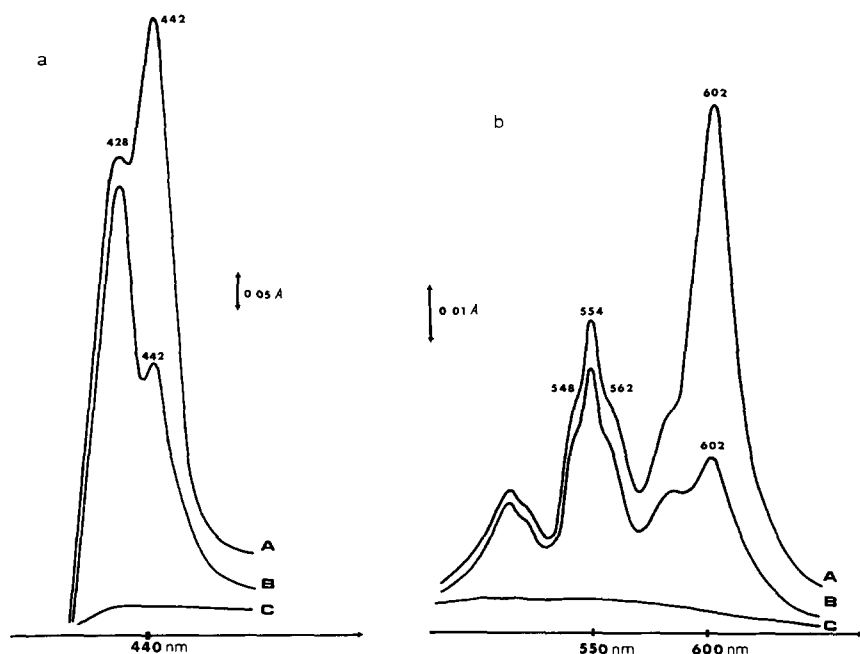


Fig. 2. Spectre absolu à basse température (réduction par le dithionite) des membranes totales de *B. coagulans* récolté en phase exponentielle de croissance ( $A\ 0.7$ ) sur milieu liquide complexe glucosé. A' en aérobiose, milieu neutralisé par  $\text{CaCO}_3$  ou par pH stat à pH 5.5, B en aérobiose, milieu neutralisé par pH stat à pH 6.5, C en anaérobiose (pH 5.5 ou pH 6.5)

à 442 nm, une bande attribuable aux cytochromes ( $a+a_3$ ) et à 428 nm, une bande devant correspondre aux bandes confondues des cytochromes ( $b+c$ ).

Quand une suspension membranaire (*cf.* Méthodes) réduite par le dithionite ou NADH est traitée par l'oxyde de carbone dans un intervalle de temps court, 30 s (Fig. 3,  $A_1$ ), le spectre de différences (réduite - CO)/réduite) présente un creux à 442 nm correspondant probablement à  $a_3\gamma$  réduite et un pic à 428 nm correspondant probablement à  $(a_3 - \text{CO})\gamma$ . Toutefois, si cette préparation est traitée par l'oxyde de carbone pendant un intervalle de temps relativement long: 3 min (Fig. 3,  $A_2$ ), on voit apparaître à 415 nm une bande attribuable à la combinaison oxycarbonée d'un cytochrome de type *o*. Le phénomène est homologue de celui observé sur *B. megaterium*<sup>15</sup>.

#### *Influence des variations de pH du milieu sur la synthèse du système respiratoire de B. coagulans*

Ayant été amenés à constater des variations d'intensité relative des bandes d'absorption du spectre cytochromique de *B. coagulans*\*, nous nous sommes attachés

\* Ces variations ont été d'abord observées au cours d'essais cherchant à supprimer du milieu de culture la présence de  $\text{CaCO}_3$  en tant qu'agent de neutralisation et à lui substituer une neutralisation continue par pH stat à pH 6.4, valeur de pH du milieu contenant  $\text{CaCO}_3$  au moment de l'ensemencement. Or le contrôle du pH des cultures sur le milieu neutralisé par  $\text{CaCO}_3$  a montré que le pH passait de 6.4 initial à 5.4 au moment de la récolte bactérienne. En fait, les bactéries cultivées à pH 5.4 avec ou sans  $\text{CaCO}_3$  présentent les mêmes caractères respiratoires.

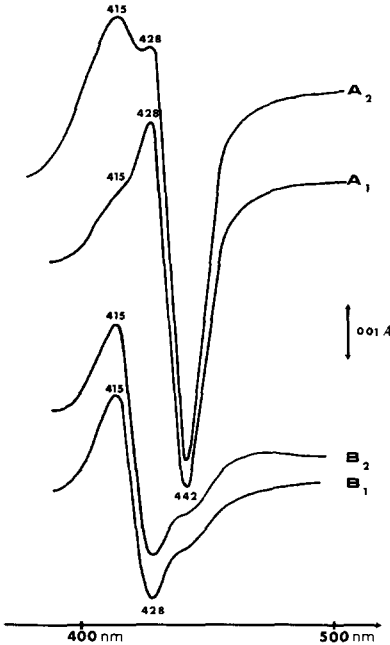


Fig 3 Spectre de différence ((réduite dithionite-CO)/(réduite dithionite)) de suspensions de membranes totales de *B. coagulans* récolté en phase exponentielle de croissance aérobie ( $A\ 0.7$ ) sur milieu complexe glucosé A, à pH 5.5, B, à pH 6.5. 1, Barbotage CO pendant 30 s, 2, barbotage CO pendant 3 min

à chercher les causes de telles variations. A la suite de nombreuses tentatives, nous avons reconnu que, dans la limite de pH 5 à 7 assurant un taux de croissance constant ( $I = 1.5$ )<sup>16,17</sup> un écart de pH relativement faible entraîne des variations importantes du système respiratoire. L'étude systématique de l'influence du pH du milieu de culture ou du milieu d'"adaptation respiratoire" a conduit aux résultats suivants.

*Caractères du système respiratoire de B. coagulans en phase exponentielle de croissance ( $A\ 0.7$ ) sur un même milieu à différents pH: 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 et 7.0*

Les valeurs des activités respiratoires mesurées en fonction du pH sont données dans le Tableau I. On voit notamment que: dans un milieu à pH 6.5, le  $Q_{O_2}$  des bacilles est égal à  $148 \pm 20$ , le  $Q_{O_2}$  des membranes (NADH  $10^{-3}$  M) à  $148 \pm 15$ :

TABLEAU I

Activités respiratoires mesurées pendant la phase exponentielle de croissance ( $A\ 0.7$ ) de *B. coagulans* sur des milieux complexes glucosés de pH différents

pH	Cultures aérobies neutralisées					par $CaCO_3$
	Par pH stat					
	5	5,5	6	6,5	7	5,4
$Q_{O_2}$ ( $\mu l\ O_2/h$ par mg protéine)	477	605	303	148	54	672

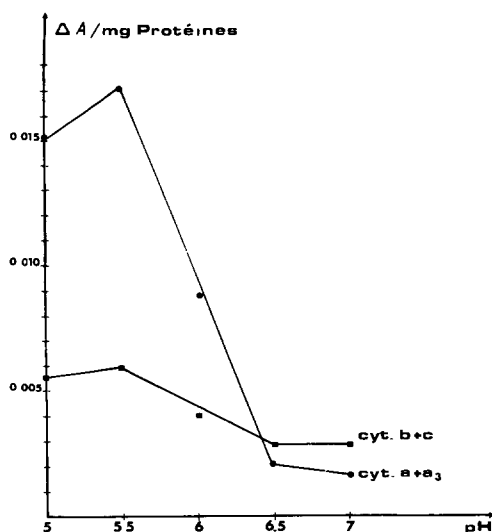


Fig. 4. Influence du pH du milieu de culture sur l'intensité des bandes d'absorption à  $\lambda$  603 nm (cytochrome  $a + a_3$ ) et  $\lambda$  560 nm (cytochrome  $b + c$ ) évaluée à température ordinaire par spectre de différence réduite dithionite/oxydé en  $\Delta A/mg$  protéines sur des membranes totales de *B. coagulans*

dans le même milieu à pH 5,5, le  $Q_{O_2}$  des bactéries récoltées dans les mêmes conditions est égal à  $605 \pm 20$ ; le  $Q_{O_2}$  des membranes (NADH  $10^{-3}$  M) à  $630 \pm 30$ .

Ainsi, une variation de pH de 6.5 à 5.5 entraîne une augmentation de 4 fois du  $Q_{O_2}$ .

L'influence du pH du milieu de culture sur les caractères spectraux apparaît nettement dans les Figs 2 et 4.

La variation d'intensité des bandes  $\alpha$  cytochromiques (Fig. 4) (spectre de différence réduite dithionite/oxydé des préparations membranaires) est maximum pour l'écart de pH 5.5–6.5. La bande  $\alpha_{560}$  nm étant environ 2 fois plus intense à pH 5.5 qu'à pH 6.5, la bande  $\alpha_{603}$  nm étant environ 9 fois plus intense à pH 5.5 qu'à pH 6.5, on voit que l'effet du pH s'exerce d'une façon prépondérante sur la bande  $\alpha_{603}$  dépendant des cytochromes ( $a + a_3$ )

*Cinétique de la synthèse du système respiratoire de B. coagulans au cours du phénomène d' "adaptation respiratoire" étudié en fonction du pH*

Cette étude a été réalisée à l'aide d'une série d'essais où *B. coagulans* se trouve dans les conditions de croissance ralentie précédemment décrites<sup>4</sup>. Ces essais n'ont été réalisés qu'aux deux pH 5.5 et 6.5 correspondants à l'écart maximum des variations du système respiratoire observées dans le cas de bactéries en cours de phase exponentielle de croissance.

*B. coagulans* est récolté à partir de cultures en anaérobiose stricte. Après avoir vérifié que ces bactéries ont un  $Q_{O_2}$  nul et une absence totale de spectres hématiniques (Figs 1,C et 2,C) quel qu'ait été le pH du milieu de culture, les essais d'adaptation respiratoire (incubés à 50 °C en présence d'air) permettent de suivre en fonction du temps d'incubation, la cinétique de synthèse du système respiratoire. Il apparaît que l'activité respiratoire après 3 h d'incubation est environ 4 fois plus élevée dans les essais à pH 5.5 que dans les essais à pH 6.5 (Fig. 5). Les concentrations en cytochromes

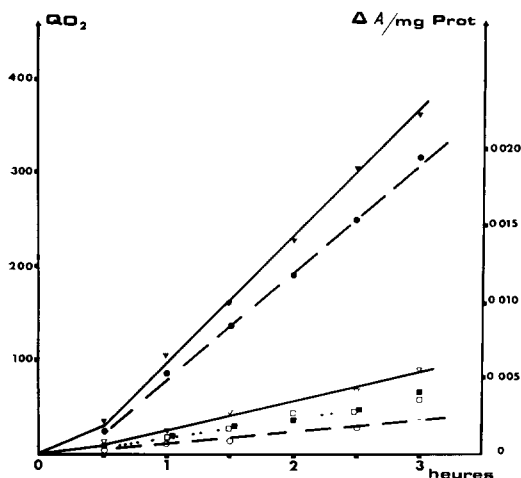


Fig. 5. Evolution du  $Q_{O_2}$  et de la teneur en cytochromes de *B. coagulans*, en fonction de la durée des essais d'adaptation respiratoire à 2 valeurs du pH maintenues constantes à l'aide d'un pH stat.  $Q_{O_2}$  ( $\mu\text{l O}_2/\text{h}$  par mg protéine) pH 5.5,  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ , pH 6.5,  $\nabla$ — $\nabla$ . Teneur en cytochromes ( $\Delta A/\text{mg}$  protéine) (déterminée par spectre de différence sur une suspension de membranes totales.  $\lambda_{603 \text{ nm}}$  ( $a+a_3$ )). pH 5.5,  $\bullet$ — $\bullet$ ; pH 6.5,  $\circ$ — $\circ$ .  $\lambda_{560 \text{ nm}}$  ( $b+c$ ): pH 5.5,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ; pH 6.5,  $\square$ — $\square$ .

mes déterminées d'après le spectre de différence à température ordinaire des membranes totales montrent que la synthèse est plus rapide à pH 5.5 qu'à pH 6.5 et que l'effet stimulant du pH est prépondérant sur la synthèse des cytochromes  $a+a_3$  (Fig. 5)

*Estimation de l'effet stimulateur de l'abaissement du pH de 6.5 à 5.5 sur les synthèses respectives des cytochromes a et  $a_3$*

En utilisant l'action de l'oxyde de carbone sur les préparations membranaires à l'état réduit (dithionite) d'après la méthode de Chance<sup>9</sup> et Smith<sup>10,15,27</sup>, nous avons cherché à déterminer si l'influence du pH s'exerçait préférentiellement sur l'une ou l'autre des composantes  $a$  ou  $a_3$  (creux  $a_3$  réduite  $\gamma$ , 442 nm; pic  $a_3$  réduite —CO  $\gamma$ , 428 nm) (Fig. 3). Nous avons déterminé que le rapport des bandes d'absorption à  $\lambda$  442 nm (creux réduite CO/réduite)/(pic réduite/oxydé) est compris entre 0.05 et 0.15 à pH 6.5 et passe à une valeur comprise entre 0.30 et 0.50 à pH 5.5. Ces valeurs permettent en tenant compte des concentrations absolues en ( $a+a_3$ ) (cf. Fig. 4) calculées à pH 6.5 et 5.5, de constater que la variation de pH entraîne un accroissement d'environ 6 fois du cytochrome  $a$  et d'environ 30 fois de l'oxydase  $a_3$ . Autrement dit cette variation de pH agit environ 5 fois plus sur la synthèse de l'oxydase  $a_3$  que sur celle du cytochrome  $a$ .

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les expériences décrites montrent que *B. coagulans* cultivé en aérobiose possède un système cytochromique dont le spectre réduit à basse température, présente des bandes  $\alpha$  et  $\gamma$  d'absorption situées aux positions des cytochromes  $b$ ,  $c_1$ ,  $c$ , ( $a+a_3$ ). L'étude spectrale de préparations membranaires réduites (dithionite ou NADH) en présence d'oxyde de carbone a permis de donner la preuve de l'existence de 2 oxydases:

le cytochrome  $a_3$  et un cytochrome  $o$ .

Que ce soit au cours de cultures aérobies ou au cours du phénomène d'"adaptation respiratoire", un faible abaissement de pH de 6.5 à 5.5 stimule la synthèse du système respiratoire se manifestant par une augmentation de 4 fois du  $Q_{O_2}$ . Cette stimulation se manifeste aussi au niveau de la synthèse du système cytochromique. Toutefois, la stimulation de la synthèse de tous les cytochromes n'est pas la même pour toutes les composantes. En effet, l'abaissement de pH de 6.5 à 5.5 n'accroît la synthèse de  $(b+c_1+c)$  que d'environ 2 fois alors qu'elle accroît celle de  $(a+a_3)$  d'environ 9 fois. De plus, grace à l'étude du spectre des dérivés oxycarbonés, nous avons réussi à dissocier l'influence du pH sur la synthèse du cytochrome  $a$  de celle du cytochrome  $a_3$ . Le cytochrome  $a$  augmente d'environ 6 fois alors que le cytochrome  $a_3$  augmente d'environ 30 fois. Il n'existe pas de corrélation directe entre l'accroissement du  $Q_{O_2}$  et l'accroissement de la teneur en oxydase; ce fait a été maintes fois observé et n'a rien de surprenant<sup>18</sup>.

L'influence de variations très limitées du pH extracellulaire 6.5 à 5.5 sur la synthèse des cytochromes et sur celle de l'oxydase  $a_3$  en particulier, n'a, à notre connaissance, jamais été mentionnée ni chez *B. coagulans*, ni chez d'autres microorganismes. Toutefois, il a été montré chez d'autres microorganismes que la synthèse de  $a+a_3$  est sensible à différents agents tels que: teneur en fer<sup>19</sup> ou en cuivre<sup>20,21,28</sup>, tension en oxygène dissout<sup>22-24</sup> ou concentration en glucose du milieu<sup>25,26</sup>. Aucun de ces agents ne semble intervenir dans nos essais puisque *B. coagulans* est cultivé dans un milieu de composition constante, dans un domaine de pH où le taux de croissance est constant<sup>16,17</sup>, et dans des conditions de culture ou d'adaptation respiratoire ou l'oxygène dissout n'est pas limitant.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Melle Anne Rousseau, Aide-Chimiste C.N.R.S., pour son aide aussi efficace que dévouée. Ce travail a bénéficié de l'aide du C.N.R.S. (E.R.A. No 172).

#### RÉFÉRENCES

- 1 Chaix, P. et Flamens, P. (1952) *Biochim. Biophys. Acta* 8, 38-48
- 2 Chaix, P. et Flamens, P. (1953) *Biochim. Biophys. Acta* 11, 530-534
- 3 Cuelleron-Flamens, P. (1954) Thèse de Doctorat d'Etat es-Sciences No 203, Lyon
- 4 Frade, R. et Chaix, P. (1973) *Biochimie* 35, 99-101
- 5 Labbe, P. et Chaix, P. (1966) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 1281-1283
- 6 Ferrandes, B. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 223, 292-308
- 7 Labbe, P., Volland, C. et Chaix, P. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 70-78
- 8 Chance, B. (1957) *Methods Enzymol.* 4, 273-329
- 9 Chance, B. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 383-395
- 10 Smith, L. (1955) *J. Biol. Chem.* 215, 833-846
- 11 Labbe, P. et Chaix, P. (1969) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51, 1642-1644
- 12 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 13 Gel'man, N. S., Lukyanova, M. A. et Ostrovskii, D. N. (1967) dans *Respiration and Phosphorylation of Bacteria* (Pinchot, G. B., ed.), pp. 90-110, Plenum Press, New York
- 14 Chaix, P. et Labbe, P. (1965) *Colloque International sur les mécanismes de régulation chez les microorganismes*, Marseille, pp. 481-490, CNRS



- 15 Broberg, P. L. et Smith, L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 131, 479-489
- 16 Chaix, P. et Petit, J. F. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 22, 66-71
- 17 Chaix, P. et Petit, J. F. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 25, 481-486
- 18 Ohaniance, L. et Chaix, P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 90, 221-227
- 19 Waring, W. S. et Werkman, C. H. (1944) *Arch. Biochem. Biophys.* 4, 75-87
- 20 Wohlrab, H. et Jacobs, E. E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 991-997
- 21 Keyhani, E. et Chance, B. (1971) *FEBS Lett.* 17, 127-132
- 22 Ephrussi, B. et Slonimski, P. P. (1950) *Biochim. Biophys. Acta* 6, 256-267
- 23 Shaeffer, P. (1952) *Biochim. Biophys. Acta* 9, 261-270
- 24 Moss, F. (1956) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 34, 395-406
- 25 Ullman, A. (1971) *Biochimie* 53, 3-8
- 26 Raily, C. et Sherman, F. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 95, 640-651
- 27 Smith, L. (1955) *J. Biol. Chem.* 215, 847-857
- 28 Wohlrab, H. et Jacobs, E. E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 998-1002