

Utilisation des enzymes en présence de solvants organiques *

par Pierre Monsan

(Laboratoire de génie biochimique, Institut National des Sciences Appliquées, avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex)

Introduction



Le fait que l'eau soit le constituant majeur de tous les systèmes vivants a conduit, pendant de nombreuses années, les biologistes à n'envisager le fonctionnement des constituants de ces systèmes que dans un environnement essentiellement aqueux. Cette attitude a été confortée par la solubilité élevée de la plupart des biomolécules (à l'exception des lipides), en milieu aqueux. Ceci explique certainement l'existence dans l'esprit de nombreux biochimistes, d'une antinomie quasi fondamentale entre la notion d'activité biologique et celle d'environnement

partiellement ou totalement non-aqueux.

Ainsi, dans le domaine particulier de l'enzymologie, par exemple, la plupart des études (production et purification des enzymes, étude de leur structure, élucidation de leur mécanisme de fonctionnement et de régulation) ont été effectuées en phase aqueuse pure.

L'intervention de solvants organiques n'a été introduite que comme moyen d'étude du mécanisme réactionnel de certaines enzymes. Deux principaux cas peuvent être distingués :

- élucidation du rôle de l'eau : l'addition de solvants organiques miscibles à l'eau permet d'abaisser la concentration de celle-ci dans le milieu et de quantifier son influence sur la valeur des paramètres cinétiques de l'enzyme (k_{cat} , K_M). Ainsi, par exemple, l'addition de dioxane a permis l'étude de l'étape de désacylation des réactions d'hydrolyse catalysées par la chymotrypsine (1, 2) et la trypsine (3, 4). De même, l'addition de solvants pouvant jouer un rôle d'accepteur analogue à celui de l'eau, notamment d'alcools, a conduit à l'explication de l'activité transférase d'hydrolases faisant intervenir un intermédiaire covalent [phosphoryl-(5, 6), glycosyl-(7, 8) ou acyl-(9, 10) enzyme].

- réactions enzymatiques à basse température : l'utilisation de mélanges de solvants non-aqueux a permis l'étude du mécanisme de réactions enzymatiques en opérant à très basse température, en l'absence de phénomènes de congélation. Il a ainsi été possible de

* Conférence présentée au cours des Rencontres nationales Université-Industrie organisées par la Société Beckmann, en mars 1980, à Paris.

mettre en évidence et de caractériser des étapes réactionnelles intermédiaires. Les résultats et potentialités de la cryo-enzymologie ont été récemment passés en revue (11-13).

A côté de ces études cinétiques et mécanistiques, il apparaît, de plus en plus nettement, que l'étude du fonctionnement des biocatalyseurs en phase strictement aqueuse ne constitue qu'un modèle très insuffisant de leur action *in vivo*, modèle dont les limitations sont de plus en plus évidentes au fur et à mesure que progresse la connaissance de la structure des systèmes membranaires. En effet, la majorité des enzymes agissent non pas à l'état libre dans le cytoplasme mais sous forme associée, notamment aux constituants membranaires de la cellule ou des organites intracellulaires, c'est-à-dire dans un micro-environnement très sensiblement différent d'une phase aqueuse homogène. Dans cette optique, l'étude du fonctionnement des enzymes en présence de solvants organiques permet d'élaborer des modèles de leur action au niveau des structures membranaires dans des conditions nettement différentes de celles de l'eau pure (3, 14, 15). Maurel (16) a montré que les effets cinétiques observés en milieu mixte eau-solvant, précédemment attribués à la modification de la constante

diélectrique du milieu (17), étaient en fait à relier à l'influence du solvant sur le phénomène d'association enzyme-substrat. On peut, de plus, souligner que, contrairement aux solvants utilisés pour de telles études (dioxane, DMSO,...), les constituants lipidiques des membranes ont une structure macromoléculaire et, de ce fait, un mécanisme d'interaction avec les molécules protéiques très sensiblement différent. Ainsi, par exemple, l'immobilisation de la lactate déshydrogénase (18) et de l'hydroxybutyrate déshydrogénase (19) en présence de lipides se traduit par une importante augmentation de la stabilité de ces enzymes. De plus, dans de nombreux cas, l'addition de solvants organiques au milieu de réaction a pour conséquence un net accroissement de l'efficacité de la catalyse enzymatique (20-23).

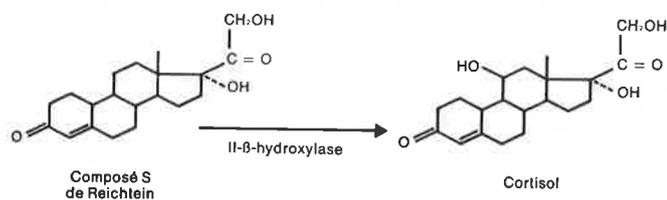
Au cours des dernières années, les exemples d'utilisation d'enzymes en présence de solvants organiques se sont multipliés (15, 24) : l'addition de solvants permet soit d'effectuer plus efficacement des réactions enzymatiques, soit de transformer des réactions d'hydrolyse en réactions de synthèse. Nous allons passer en revue les principaux exemples de cette nouvelle voie d'application des bio-catalyseurs.

I. Substrat peu soluble en phase aqueuse

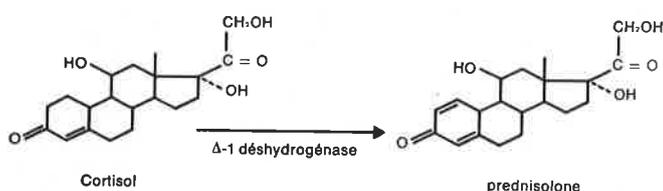
Les limitations inhérentes à l'utilisation de milieux totalement aqueux lors de l'étude de systèmes enzymatiques sont particulièrement évidentes lorsque leurs substrats ont un caractère hydrophobe tellement marqué qu'ils présentent une solubilité extrêmement faible dans l'eau. C'est notamment le cas de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des lipides.

Ainsi, par exemple, la mise en évidence et la détermination d'une activité phospholipase chez des champignons, *Rhizopus arrhizus* et *Mucor javanicus*, n'a pu être possible qu'en utilisant des conditions d'analyse dans lesquelles le substrat, la lécithine d'œuf, est dissous dans un solvant organique, l'éther isopropylique (25). Ceci évite la solubilisation préalable des systèmes enzymatiques fortement liés aux structures membranaires, solubilisation qui peut s'accompagner d'une modification importante des propriétés catalytiques de ces systèmes.

De même, l'utilisation de mélanges solvant organique-eau permet d'augmenter la solubilité des stéroïdes et facilite leur conversion par des enzymes isolées ou par des cellules non proliférantes. Mosbach et Larsson (26) ont décrit la transformation du composé S de Reichstein, dissous dans une solution à 2,5 % de DMSO dans l'eau, en cortisol par une préparation de cellules de *Curvularia lunata* incluses dans un gel de polyacrylamide dont l'activité II- β -hydroxylase est préservée après inclusion :



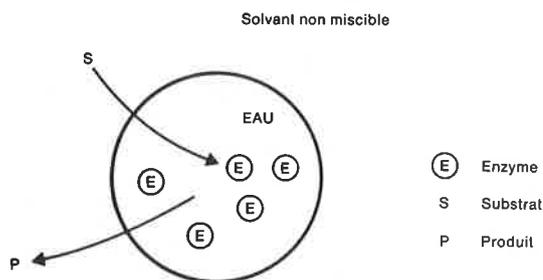
oxydé en prednisolone par une préparation de Δ -1 déshydrogénase purifiée de *Corynebacterium simplex* (26) :



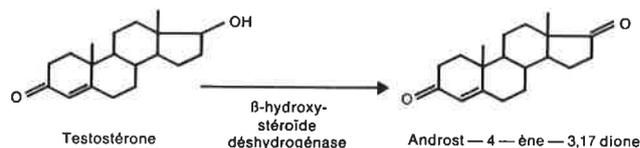
Une stéroïde estérase de *Corynebacterium* a été utilisée pour hydrolyser l'acétate de testostérone, en solution dans un mélange eau/DMF, en testostérone (27). Le groupe de D. Thomas a étudié l'oxydation de l'androstérone par une préparation de (α -stéroïde

déshydrogénase de *Pseudomonas testosteroni* immobilisée, par réticulation, en présence de NAD^+ (28). La teneur optimale en méthanol, qui favorise la solubilité du substrat dans le milieu de réaction, est de 5 % (v/v). Pour les concentrations supérieures d'alcool, un effet dénaturant est observé. L'enzyme immobilisée est, toutefois, nettement moins sensible à cet effet que l'enzyme libre. La consommation de coenzyme est limitée en effectuant sa régénération par l'oxygène en présence de phénazine méthosulfate (PMS).

Cremonesi et coll. (29-31) ont développé un procédé de transformation des stéroïdes en système biphasique, dans lequel l'enzyme et le coenzyme éventuel se trouvent dans la phase aqueuse, alors que le substrat et le produit sont dissous dans un solvant organique non miscible à l'eau (schéma 1) :

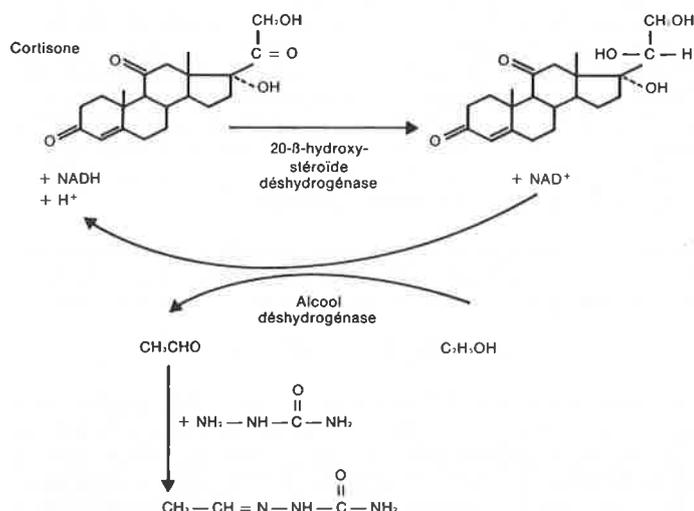


Une telle mise en œuvre limite l'effet dénaturant du solvant sur l'enzyme et surtout permet de bénéficier de la solubilité nettement plus élevée du substrat et des produits dans la phase organique : la vitesse de la réaction enzymatique est toujours maximale et la récupération du produit est facilitée. Cette approche a été appliquée à l'oxydation de différents stéroïdes (estradiol, estrone, testostérone,...) dissous dans l'acétate d'éthyle par l'oxygène en présence de laccase A de *Polyporus versicolor* (29). La testostérone peut être oxydée en androst-4-ène-3,17 dione par le NAD^+ en présence de β -hydroxystéroïde déshydrogénase de *Pseudomonas testosteroni* (30) :



Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant comme solvant l'acétate de butyle dans lequel les stéroïdes sont environ 500 fois

plus solubles que dans l'eau. Il en est de même dans le cas de la réduction de la cortisone par le NADH en présence de 20- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (31). Il est possible de n'employer qu'une quantité catalytique de NADH, en régénérant celui-ci par couplage de la réduction du stéroïde avec l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde catalysée par l'alcool déshydrogénase. La réversion de cette dernière réaction est évitée en piégeant l'acétaldéhyde par réaction irréversible avec le semi-carbazide :



On atteint ainsi un rendement de 100 %, alors que la réduction chimique de la cortisone par le borohydrure de sodium conduit à un rendement de 60 % seulement.

Buckland et coll. (32) ont également utilisé des solvants organiques non miscibles à l'eau pour effectuer l'oxydation du cholestérol en cholesténone par l'oxygène de l'air en présence de cellules entières de *Nocardia* conservées sous forme congelée. Les taux de conversion les plus élevés sont obtenus en prenant comme solvant le toluène, l'hexadécane, le tétrachlorure de carbone et l'éther. Toutefois, le tétrachlorure de carbone présente l'avantage de ne pas être inflammable. La vitesse de production de cholesténone est de 7 g.h⁻¹ à 20 °C en mettant 100 g de cellules en contact avec 200 ml de solution à 16 % (P/V) de cholestérol dans du tétrachlorure de carbone. Cette vitesse de réaction est environ 150 fois supérieure à celle obtenue en opérant en milieu totalement aqueux. La présence d'eau est cependant nécessaire car aucune activité n'est observée en utilisant une préparation de cellules de *Nocardia* lyophilisées. Les cellules peuvent, en outre, être séparées en fin de réaction et réutilisées.

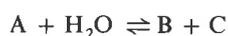
L'effet dénaturant des solvants organiques sur certains substrats macromoléculaires a pu être caractérisé par des méthodes enzymatiques : l'endonucléase S1 d'*Aspergillus oryzae*, spécifique de la dégradation de l'ADN monocaténaire, a été employée en présence de concentrations élevées de solvants organiques (DMSO, DMF, formamide, formaldéhyde) pour étudier le phénomène de dénaturation de l'ADN bicaténaire par ces solvants (33, 34).

II. Réactions de synthèse

Lorsque l'on considère les possibilités de la catalyse enzymatique, on observe que, sur les 2 000 enzymes qui ont été répertoriées, seule une dizaine sont utilisées à grande échelle et qu'il s'agit, pour l'essentiel, d'hydrolases (seule la glucose isomérase fait exception). Or, l'apport le plus significatif de la catalyse enzymatique dans le domaine de la biotechnologie ne peut résulter que de la réalisation de réactions de synthèse. Mais, ces réactions sont des réactions endergoniques, c'est-à-dire des réactions qui nécessitent, pour avoir lieu dans les conditions biologiques de mise en œuvre, un apport énergétique réalisé généralement par l'intervention d'un coenzyme ou d'une forme activée du substrat (ce qui correspond au couplage de la réaction endergonique avec une réaction exergonique). Ceci pose le problème de l'addition d'un coenzyme, consommé en quantité stœchiométrique, au milieu de réaction et, donc, de la régénération de celui-ci si l'on veut considérer un système économiquement envisageable.

Une approche alternative de telles réactions de synthèse consiste à mettre à profit le fait que les réactions d'hydrolyse sont généralement des réactions équilibrées. Il est donc possible, en modifiant les conditions opératoires, de transformer une réaction d'hydrolyse en réaction de synthèse, en utilisant la même enzyme (un catalyseur n'ayant aucune influence sur la position d'un équilibre réactionnel), et de transformer ainsi une hydrolase en « synthétase ».

Si l'on considère une réaction d'hydrolyse :



on voit que la réversion de cette réaction peut être prévue par simple application de la loi d'action de masse. Il faut augmenter la concentration des constituants B et C et/ou diminuer celle du constituant A et de l'eau.

L'augmentation de la concentration des molécules que l'on veut condenser est utilisée, notamment, dans la réaction de synthèse de plastéines à partir de peptides (35-39). L'intervention de solvants organiques peut en revanche permettre :

- soit d'abaisser la teneur en eau du milieu par addition d'un solvant miscible (alcool, DMSO, acétone,...),

- soit d'abaisser la concentration du constituant A en l'éliminant du milieu aqueux par extraction dans une phase organique non miscible (chloroforme...) au fur et à mesure de sa formation.

1. Addition d'un solvant miscible à l'eau

La concentration élevée de l'eau rend compte du fait que toutes les réactions produisant de l'eau soient défavorisées en phase aqueuse. Or, l'eau est l'un des produits de nombreuses réactions de très grande importance biologique : synthèse de liaisons peptidiques, osidiques, phosphates, esters,... De ce fait, l'abaissement de la concentration (il faudrait plutôt employer le terme activité) de l'eau peut se traduire par la transformation, à des degrés divers, de réactions d'hydrolyse en réactions de synthèse.

Ainsi, l'addition, en proportions variables, d'un mélange éthanol-glycérol 1/1 (V/V) permet la synthèse de de N-acétyl-L-tyrosinate d'éthyle à partir de N-acétyl-L-tyrosine en présence d' α -chymotrypsine (40) : le pourcentage volumique optimal de solvant (éthanol-glycérol) est de 50 % pour l'enzyme libre et 70 à 80 % pour l'enzyme immobilisée sur polyacrylamide. Les taux de synthèse atteints à l'équilibre sont respectivement de 30 % et de 40 %. La même réaction peut également être catalysée par la subtilisine Carlsberg (40). Mais, dans le cas de cette dernière enzyme, contrairement à celui de l' α -chymotrypsine, la forme libre s'avère moins sensible à la dénaturation que la forme immobilisée. En effet, l'un des problèmes les plus importants rencontrés est le phénomène de dénaturation qui accompagne le fonctionnement de l'enzyme en présence de proportions élevées de solvant. L'alcool isopropylique a été récemment signalé comme étant particulièrement compatible avec la subtilisine Carlsberg (41).

Butler et Reithel (42) ont étudié l'influence de l'addition de différents solvants sur la synthèse de l'urée à partir de carbonate d'ammonium catalysée par l'uréase, réaction qui s'accompagne de la libération de deux molécules d'eau par molécule d'urée. Toutefois, les conditions optimales de synthèse de l'urée s'avèrent être peu compatibles avec la stabilité de l'enzyme, d'une part, et la solubilité du substrat, d'autre part. Ces deux derniers paramètres sont en outre antagonistes : les solvants compatibles avec la

stabilité de l'uréase, l'acétone en particulier, n'autorisent pas la dissolution de quantités importantes de carbonate d'ammonium.

Dans le cas de la synthèse de liaisons peptidiques, l'addition de solvants permet également de transformer une réaction d'hydrolyse en réaction de synthèse. Alors que, dans l'eau pure, 80 % des liaisons Arg⁶³-Ile de l'inhibiteur de la trypsine extrait du soja sont hydrolysées par cette enzyme, on observe que, en présence de 60 % de glycérol, seulement 33 % des liaisons sont hydrolysées à l'équilibre (42). Un effet semblable est noté pour la synthèse de benzyloxycarbonyl-L-tryptophane glycineamide en présence de chymotrypsine, pour la condensation de glycineamide et de L-méthionine amide sur le groupe acide carboxylique terminal de différents peptides (42) et pour la resynthèse de la ribonucléase S (43). L'effet positif de l'addition de solvants sur la synthèse de telles liaisons peptidiques est attribué, notamment pour les faibles teneurs en solvant, beaucoup plus à la diminution de la constante d'équilibre de la réaction de transfert des protons du groupe acide carboxylique au groupe aminé terminal des substrats (42, 43). Dans un domaine voisin, celui de la synthèse de plastéines à partir de peptides, Yamashita et coll. (37) ont montré que l'addition de dioxane ou d'acétone avait pour effet d'augmenter la productivité relative de plastéines à partir d'un hydrolysât d'ovalbumine, catalysée par la chymotrypsine immobilisée.

Des préparations de lipases purifiées de différents micro-organismes catalysent la synthèse de liaisons esters à partir d'acide oléique et de nombreux types d'alcools avec des spécificités variables vis-à-vis des types d'alcools (44).

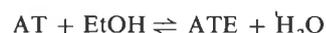
Le problème le plus important rencontré, lors de l'étude du déplacement d'un équilibre réactionnel par addition d'un solvant miscible à l'eau, est certainement la nécessité d'établir un compromis entre l'effet positif de l'accroissement de la teneur en solvant sur le taux de synthèse et l'effet négatif de ce même accroissement sur la stabilité. On obtient ainsi des systèmes réactionnels séduisants quant à l'efficacité de la synthèse, mais qui s'avèrent inutilisables dès que l'on considère la durée de vie du catalyseur. Une première solution consiste à utiliser l'enzyme sous forme immobilisée : l'établissement des liaisons enzyme-support a, en général, pour effet d'augmenter la résistance aux facteurs de dénaturation (45). Une seconde solution est de séparer physiquement la phase aqueuse contenant l'enzyme de la phase organique : ceci peut être obtenu en utilisant un solvant non miscible à l'eau.

2. Addition d'un solvant non miscible à l'eau

En plus, du fait qu'elle limite le contact direct entre l'enzyme et le solvant, la séparation du milieu liquide en deux phases non miscibles présente le double avantage d'offrir un réservoir important de substrat dans la phase organique (l'enzyme fonctionne à une vitesse maximale dans la phase aqueuse) et de permettre une élimination continue du produit (d'où un déplacement de l'équilibre de réaction vers la synthèse). Il est évident que cette approche suppose que la solubilité du substrat et, surtout,

du produit soient plus grandes dans la phase organique que dans la phase aqueuse. Dans le cas de molécules hydrophiles, ceci peut être obtenu en utilisant un contre-ion aliphatique (molécules ioniques) ou des produits facilitant le transfert de phase. L'enzyme peut être, dans la phase aqueuse, soit sous forme libre, soit sous forme immobilisée. Les avantages de ce type de mise en œuvre ont été discutés par le groupe de Berezin (46, 47) et appliqués à la synthèse de liaisons esters (47) et phosphates (48). La chymotrypsine absorbée sur verre poreux permet la synthèse de N-acétyl-L-tryptophanate d'éthyle avec un rendement proche de 100 % en système liquide biphasique eau-chloroforme, alors que le rendement n'est que de 0,01 % si on opère en phase aqueuse (47). Dans un système analogue, une phosphatase catalyse la synthèse de glycérophosphate à partir de glycérol et de phosphate de sodium avec un rendement de 30 %. Dans ce dernier cas, la solubilité du produit final dans la phase organique est favorisée par l'addition d'ions tétrabutylammonium.

Nous avons appliqué une approche semblable à la synthèse de N-acétyl-L-tyrosinate d'éthyle (ATE) à partir de N-acétyl-L-tyrosine (AT) et d'éthanol (EtOH) en présence de chymotrypsine (49) :



La phase organique (chloroforme) contient initialement l'AT (10^{-2} M) et l'éthanol (1M). La phase aqueuse contient la chymotrypsine immobilisée sur silice aminée activée par le glutaraldéhyde. Le taux de synthèse d'ATE, qui est maximal et égal à 40 % après 24 heures de réaction, est fortement dépendant du pourcentage volumique de la phase aqueuse : on observe un maximum lorsque le pourcentage d'eau est égal à 5,6 % et l'efficacité de la réaction diminue très rapidement dès que l'on s'éloigne, dans un sens ou dans l'autre, de cette valeur. Le pH de la phase aqueuse est également un paramètre important : on observe un optimum à pH 6,8, soit à une valeur nettement plus faible que le pH optimal d'hydrolyse de l'ATE (pH 8,0).

Récemment, l'application des systèmes biphasiques à la synthèse de liaisons peptidiques a été rapportée (50).

Il est également possible de concevoir des systèmes biphasiques dans lesquels la phase aqueuse est réduite à sa plus simple expression en solubilisant l'enzyme à l'intérieur des micelles inverses obtenues en dispersant un tensio-actif dans une phase organique. L'enzyme ainsi dispersée dans la phase organique conserve son activité enzymatique, ainsi que Martinek et coll. (51) l'ont montré pour la chymotrypsine et la peroxydase solubilisées dans des micelles de di(2-éthyl-hexyl) sulfosuccinate de sodium (Aérosol AOT) dans l'octane. Dans le cas de la peroxydase catalysant l'oxydation du pyrogallol en micelles inverses, on n'observe pas de phénomène d'inhibition par excès de substrat, contrairement à ce qui est obtenu dans la phase aqueuse (51). La ribonucléase, solubilisée dans un système identique, conserve également son activité vis-à-vis du CMP-cyclique et de l'ARN (52). Des mesures de dichroïsme circulaire ont montré que la ribonucléase présentait, dans les micelles inverses, une structure pratiquement identique à celle de l'enzyme en solution dans l'eau.

Conclusion

L'utilisation des enzymes en présence de solvants organiques suscite un intérêt croissant. Ce mode nouveau de mise en œuvre de la catalyse enzymatique s'avère, en effet, extrêmement prometteur aussi bien dans le domaine de la recherche fondamentale que dans celui de la recherche appliquée.

L'étude du fonctionnement des enzymes en présence de solvants non-aqueux permet de quantifier l'influence d'un milieu sensible-ment différent de l'eau pure sur la cinétique enzymatique et d'élaborer ainsi des modèles du comportement des biocatalyseurs dans les cellules, au niveau des structures membranaires.

L'addition de solvants organiques miscibles ou non-miscibles au

milieu de réaction augmente l'efficacité de la catalyse enzymatique lorsque le substrat présente une faible solubilité en milieu aqueux et, surtout, permet de transformer une réaction d'hydrolyse en réaction de synthèse. Il est ainsi envisageable d'effectuer des réactions de synthèse enzymatique ne nécessitant pas l'addition de cofacteurs, en utilisant les nombreuses hydrolases connues dans des conditions opératoires telles que les réactions d'hydrolyse soient transformées en réactions de synthèse. Les potentialités de ce type nouveau de catalyse, notamment dans le domaine de la synthèse de dérivés d'acides aminés et de peptides, paraissent très grandes et susceptibles de déboucher sur de nouvelles applications de la catalyse enzymatique et sur le développement d'une véritable « biochimie organique ».

Bibliographie

- (1) K. Tanizawa, et M. L. Bender, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 2130.
- (2) M. L. Bender, A. B. Cottingham, L. K. Sun et K. Tanizawa, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977, **86A**, 405.
- (3) M. Castañeda-Agullo et L. M. Del Castillo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **139**, 398.
- (4) M. Castañeda-Agullo, G. Davila, C. Oliver, T. Cruz et L. M. Del Castillo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **191**, 362.
- (5) C. G. Tyszkiewicz et M. Calvin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **50**, 376.
- (6) J. Ullrich et M. Calvin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **57**, 190-191.
- (7) G. Van Der Groen, J. Wouters-Leysen, M. Yde et C. K. De Bruyne, *Eur. J. Biochem.*, 1973, **38**, 122.
- (8) G. M. Umezurike, *Biochem. J.*, 1978, **175**, 455.
- (9) A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 635.
- (10) J. Fastrez et A. R. Fersht, *Biochemistry*, 1973, **12**, 2025.
- (11) P. Douzou, *Trends Biochem. Sci.*, 1976, **1**, 25.
- (12) P. Douzou, *Adv. Enzymol.*, 1977, **45**, 157.
- (13) P. Douzou, « Cryobiochemistry : an introduction », Academic Press, New York, 1976.
- (14) G. L. Tritsch, P. R. Niswander, J. Rosenfeld, A. Nechaev et A. Mittelman, *Mol. Cell. Biochem.*, 1976, **12**, 93.
- (15) L. G. Butler, *Enzyme Microb. Technol.*, 1979, **1**, 253.
- (16) P. Maurel, *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 1677.
- (17) M. Castañeda-Agullo et L. M. Del Castillo, *J. Gen. Physiol.*, 1959, **42**, 617.
- (18) J. N. Barbotin, *FEBS Letters*, 1976, **72**, 93.
- (19) J. N. Barbotin, M. Levy et M. Joncourt, *J. Membrane Sci.*, 1979, **5**, 137.
- (20) T. Tosa, T. Mori et I. Chibata, *Enzymologie*, 1970, **40**, 48.
- (21) K. H. Tan et R. Lovrien, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 3278.
- (22) H. Wan et C. Horvath, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **410**, 135.
- (23) H. H. Weetall et W. P. Vann, *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, **18**, 105.
- (24) K. Martinek et I. V. Berezin, *J. Solid-Phase Biochem.*, 1977, **2**, 343.
- (25) J. A. Blain, J. D. E. Patterson, C. E. Shaw et M. Waheed Akhtar, *Lipids*, 1976, **11**, 553.
- (26) K. Mosbach et P. O. Larsson, *Biotechnol. Bioeng.*, 1970, **12**, 19.
- (27) M. J. Grove, G. W. Strandberg et K. L. Smiley, *Biotechnol. Bioeng.*, 1971, **13**, 709.
- (28) M. D. Legoy, V. Larreta Garde, F. Ergan et D. Thomas, *J. Solid-Phase Biochem.*, 1979, **4**, 143.
- (29) G. Lugaro, G. Carrea, P. Cremonesi, M. M. Casellato et E. Antonini, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, **159**, 1.
- (30) P. Cremonesi, G. Carrea, G. Sportoletti et E. Antonini, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, **159**, 7.
- (31) P. Cremonesi, G. Carrea, L. Ferrara et E. Antonini, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, **17**, 1101.
- (32) B. C. Buckland, P. Dunnill et M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, **17**, 815.
- (33) S. T. Case et R. F. Baker, *Anal. Biochem.*, 1975, **64**, 477.
- (34) J. R. Hutton et J. G. Wetmur, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, **66**, 942.
- (35) K. S. Makarov, *Uch. Zap. Yarosl. Gos. Pedagog. Inst.*, 1973, **122**, 63.
- (36) S. Arai, M. Yamashita et M. Fujimaki, *Cereal Foods World*, 1975, **20**, 107.
- (37) M. Yamashita, S. Arai et M. Fujimaki, *J. Agric. Food Chem.*, 1976, **24**, 1100.
- (38) S. Eriksen et I. S. Fagerson, *J. Food Sci.*, 1976, **41**, 490.
- (39) C. Pallavicini et A. Zamorani, *Ind. Aliment.*, 1978, **17**, 39.
- (40) R. G. Ingalls, R. G. Squires et L. G. Butler, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, **17**, 1627.
- (41) J. F. Beck et J. F. Mc Mullan, *Can. J. Chem.*, 1979, **57**, 2516.
- (42) G. A. Homandberg, J. A. Mattis et M. Laskowski Jr., *Biochemistry*, 1978, **17**, 5220.
- (43) G. A. Homandberg et M. Laskowski Jr., *Biochemistry*, 1979, **18**, 586.
- (44) S. Okomura, M. Iwai et Y. Tsujisaka, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **575**, 156.
- (45) G. Durand et P. Monsan, « Les enzymes immobilisées », APRIA, Paris, 1975.
- (46) K. Martinek et I. V. Berezin, *J. Solid-Phase Biochem.*, 1977, **2**, 343.
- (47) A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, K. Martinek et I. V. Berezin, *Biotechnol. Bioeng.*, 1977, **19**, 1351.
- (48) K. Martinek, A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, A. N. Semenov et I. V. Berezin, *Bioorg. Khim.*, 1977, **3**, 696.
- (49) D. Tarquis, P. Monsan et G. Durand, *Bull. Soc. Chim.*, 1980, **II-76**.
- (50) P. Kuhl, A. Konnecke, G. Doring, H. Daumer et H. D. Jakubke, *Tetrahedron Letters*, 1980, **21**, 893.
- (51) K. Martinek, A. V. Levashov et I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1977, **236**, 920.
- (52) R. Wolf et P. L. Luisi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, **89**, 209.