

BIOCHIMIE

Dosage et propriétés d'algines d'origine microbienne

par J. FRANSSSEN et Ch. JEUNIAUX (*),
(Institut Léon Fredericq, Biochimie, Université de Liège).

Résumé. — Des bactéries alginolytiques isolées de thalles de *Fucus* spp. ont été cultivées en milieu liquide où elles libèrent des exo-alginases. Les filtrats de ces cultures ont été utilisés pour mettre au point une méthode viscosimétrique permettant le dosage quantitatif et spécifique des alginases. Nous avons défini une unité alginolytique proportionnelle à la valeur du coefficient angulaire de la droite représentant les variations de fluidité spécifique du milieu réactionnel en fonction de la durée de l'incubation.

INTRODUCTION.

On sait qu'il existe une certaine corrélation entre la composition de l'arsenal enzymatique digestif des animaux et la nature de leur alimentation. La sécrétion d'alginate par certains Gastéropodes marins et par certains Oursins a pu être considérée par quelques auteurs comme un cas d'adaptation biochimique à une alimentation riche en acide alginique, polysaccharide de structure des Phaeophycées (algues brunes). C'est dans le but de préciser l'origine, la distribution et la localisation des alginases dans les tissus du système digestif des animaux que nous avons cherché à mettre au point une méthode quantitative et spécifique pour le dosage de ces polymannuronidases.

Diverses méthodes ont été proposées pour le dosage de l'almi-

(*) Bénéficiaire d'un Crédit aux Chercheurs du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

Présentés par M. Marcel FLORIN.

nase. Les unes consistent à mesurer le produit de la réaction enzymatique (dosage des acides uroniques libérés à partir du substrat, ou dosage du pouvoir réducteur). Une autre méthode consiste à mesurer directement la disparition du substrat au cours de l'hydrolyse enzymatique et présente par conséquent l'avantage de mesurer réellement l'activité de l'alginate et non celle d'une série d'enzymes catalysant des hydrolyses successives : il s'agit de la méthode viscosimétrique qui mesure les variations de viscosité d'une solution d'alginate sodique au cours de l'incubation en présence d'alginate.

L'utilisation de méthodes viscosimétriques pour la mise en évidence et le dosage quantitatif de diverses hydrolases a été proposée par plusieurs auteurs. Citons entre autres les travaux de Ingelman et Malmgren (1949) sur les polymétaphosphatases, ceux de Hultin (1948) sur l'hyaluronidase ; Levinson et Reese (1950) étudièrent la diminution de viscosité d'une solution de carboxyméthylcellulose sous l'action des cellulases. Thjötta et Kåss (1945) de même que Kooiman (1954) utilisèrent cette méthode pour l'étude d'alginate microbiennes. Eppley et Lasker (1959) l'employèrent également pour mettre en évidence la présence d'une alginate chez *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinoderme).

Cependant, à notre connaissance, une méthode viscosimétrique pour le dosage quantitatif des activités alginolytiques ne semble pas avoir fait l'objet d'une mise au point détaillée. Celle-ci constitue l'objet du présent travail. L'alginate utilisée pour la mise au point de cette méthode a consisté en filtrats de cultures de bactéries alginolytiques, isolées à partir de thalles de *Fucus* spp. en décomposition.

1. — ÉTUDE VISCOSIMÉTRIQUE DES SOLUTIONS D'ALGINATE SODIQUE.

Les solutions des hauts polymères organiques solubles sont généralement visqueuses. Leur degré de viscosité peut être exprimé en unités viscosimétriques ou unités centipoises. La viscosité est proportionnelle au poids moléculaire de ces substances et par conséquent à leur degré de polymérisation. C'est

notamment le cas de polymétaphosphates, d'

L'action des hydrolases quant d'abord leur de d'une hydrolyse enzymatique diminution de viscosité d'

Pour mesurer la viscosité nous avons utilisé un viscosimètre pour mesurer le temps de chute connus à travers une viscosité au cours d'une incubation est calculé sur une distance de viscosité ou unités

η_{sp}

où nous avons :

η_{sp} = viscosité, en un
 T = temps de chute
 D_b = densité de la bille
 D_s = densité de la solution
 K = constante dépendant ainsi que de la

Toutes nos mesures sont constantes de la bille t

diamètre : 15.65 mm
 poids : 4.795 gr
 densité : 2.391

Le diamètre du tube de viscosité K dépendant du tube spécifique, qui est la viscosité solution, a été définie p

dans laquelle η_{abs} est la viscosité intrinsèque et η_{sol} celle du solvant

notamment le cas de l'amylose, de l'acide hyaluronique, des polymétaphosphates, de la pectine et de l'alginate sodique.

L'action des hydrolases spécifiques de ces polymères provoquant d'abord leur dépolymérisation, la première indication d'une hydrolyse enzymatique consiste notamment dans la diminution de viscosité des solutions de ces polymères.

Pour mesurer la viscosité des solutions d'alginate sodique, nous avons utilisé un viscosimètre d'Hoeppler, qui permet de mesurer le temps de chute d'une bille de densité et de diamètre connus à travers une solution d'alginate sodique à 0,1 % au cours d'une incubation à 30° C. Le temps de chute de cette bille est calculé sur une distance de 50 mm. Il est converti en unités de viscosité ou unités centipoises d'après la formule suivante :

$$\eta_{sp} = T \cdot (D_b - D_s) \cdot K$$

où nous avons :

- η_{sp} = viscosité, en unités centipoises
- T = temps de chute de la bille en secondes
- D_b = densité de la bille utilisée
- D_s = densité de la solution utilisée
- K = constante dépendant du calibre du tube de chute utilisé ainsi que de la bille

Toutes nos mesures furent effectuées à 30° C \pm 0,5° C. Les constantes de la bille utilisée étaient :

diamètre : 15.65 mm
 poids : 4.795 gr
 densité : 2.391

Le diamètre du tube de chute était de 15.923 mm et la constante K dépendant du tube et de la bille était de 0.110. La viscosité spécifique, qui est la part de la viscosité due aux substances en solution, a été définie par la relation suivante :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{abs} - \eta_{solv}}{\eta_{solv}}$$

dans laquelle η_{abs} est la viscosité de la solution en centipoises, et η_{solv} celle du solvant.

La fluidité spécifique Φ_{sp} de la solution est la réciproque de la viscosité spécifique.

Nous avons utilisé une solution mère d'alginate sodique à 0.4 %, préparée en chauffant sur agitateur magnétique à la température de 70° C pendant 60 à 90 minutes.

D'après Bolliger et Mungel (1958), l'alginate sodique se dépolymériserait à 100° C ; sa préparation ne devrait pas se faire à une température supérieure à 70° C. Avec une solution à 0.4 % incubée à 100° C, nous avons en effet observé une perte de viscosité de près de 80 % pour des incubations d'une durée de 3 heures. L'alginate de soude étant un polyélectrolyte doué de propriétés diélectriques, l'addition d'un tampon (conc. finale 0.1 M) à sa solution aqueuse provoque une forte chute de viscosité. Les résultats expérimentaux, obtenus à partir d'une solution d'alginate sodique à 0.1 % tamponnée au tris-HCl ou KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 (conc. finale 0.1 M), à des valeurs de pH comprises entre 6.1 et 8.5, montrèrent une perte de viscosité linéaire, atteignant une valeur de 30 %, la viscosité maximum s'observant à pH 8.5. Pour des valeurs de pH inférieures à 4.2, l'alginate de soude précipite sous la forme d'acide alginique.

2. — PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS D'ALGINASES D'ORIGINE MICROBIENNE.

La production d'alginate par des bactéries a été décrite par différents auteurs. Ces bactéries sont abondantes dans les eaux marines et le sol. Elles appartiennent notamment aux genres *Aerobacter* et *Escherichia* (Katsuhiko et Yoshiaki, 1956 ; Norimasa et Katsuhiko, 1957) ; des genres nouveaux furent créés pour classer d'autres espèces alginolytiques : *Alginovibrio*, *Alginomonas*, *Alginobacter* (Bernfeld, 1962).

Ne disposant pas de souches des espèces bactériennes alginolytiques citées ci-dessus, nous avons isolé des germes alginolytiques à partir d'algues brunes plus ou moins putréfiées. Nous avons adopté un milieu de culture de composition identique à celui de Czapek, en remplaçant le glucose par de l'alginate de soude à 0.5 %. Le milieu est ajusté au pH désiré puis stérilisé à l'autoclave (10 minutes à 120° C et 1 kg de pression). Les

bactéries furent cultivées de soude au pH 7.5. Utilisées, dont la seule souche est constituée par l'alginate d'une production d'alginate

Parmi les colonies a nous avons sélectionné particulièrement rapides et opaques punctiformes de colonies de même forme

Ces deux colonies furent position minérale de ce milieu gélosés. Ce milieu est mis par boîte), installées en après stérilisation et

Les cultures se développent petites masses granuleuses. Après 7 jours de culture après centrifugation (4000 g) servir d'extraits enzymatiques concentration de 3 ml de total, tamponné au Na_2HPO_4 , à pH 7.2 (conc.

Cinétique de la lyse

Nous avons suivi le développement d'alginate sodique en pH F₁. Le Tableau I montre la viscosité spécifique et le pH au cours de 135 minutes de culture trent (Fig. 1) que la viscosité est rapide pendant les 60 minutes n'être plus mesurable.

Exprimées graphiquement les courbes de viscosité et celles de la viscosité d'incubation se traduisent

n est la réciproque de la
re d'alginate sodique à
tateur magnétique à la
minutes.

alginate sodique se dépo-
ne devrait pas se faire à
vec une solution à 0.4 %
servé une perte de visco-
sités d'une durée de 3
polyélectrolyte doué de
un tampon (conc. finale
ne forte chute de viscosité.
à partir d'une solution
de tris-HCl ou KH_2PO_4 —
valeurs de pH comprises
orte de viscosité linéaire,
scosité maximum s'obser-
H inférieures à 4.2, l'algi-
d'acide alginique.

D'ALGINASES D'ORIGINE

bactéries a été décrite par
abondantes dans les eaux
nt notamment aux genres
et Yoshiaki, 1956 ; Nori-
res nouveaux furent créés
inolytiques : *Alginovibrio*,
1962).

spèces bactériennes algino-
s isolé des germes algino-
plus ou moins putréfiées.
re de composition identique
e glucose par de l'alginate
é au pH désiré puis stérilisé
et 1 kg de pression). Les

bactéries furent cultivées à 27° C sur des plaques d'agar-alginate de soude au pH 7.5. Une croissance rapide sur ces milieux gélosés, dont la seule source de carbone (autre que l'agar-agar) est constituée par l'alginate, a été interprétée comme l'indice d'une production d'alginase.

Parmi les colonies alginolytiques isolées à partir des *Fucus*, nous avons sélectionné deux souches, dont la croissance était particulièrement rapide. La première (F_1) forme des colonies opaques punctiformes de couleur blanche, la seconde (F_2) forme des colonies de même forme, mais de couleur brune.

Ces deux colonies furent cultivées en milieu liquide ; la composition minérale de ce milieu est la même que celle des milieux gélosés. Ce milieu est réparti dans des boîtes de Roux (100 ml par boîte), installées en position couchée dans une étuve à 27° C, après stérilisation et inoculation de la semence bactérienne.

Les cultures se développent généralement sous la forme de petites masses granuleuses, réparties uniformément dans le milieu. Après 7 jours de culture, nous avons effectué les prélèvements qui, après centrifugation (10 min. à 3 000 rpm), étaient destinés à servir d'extraits enzymatiques. Ces filtrats furent utilisés à la concentration de 3 ml d'extrait pour 40 ml de milieu réactionnel total, tamponné au moyen d'une solution de KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , à pH 7.2 (conc. finale 0.1 M).

Cinétique de la lyse enzymatique de l'alginate sodique étudiée par viscosimétrie.

Nous avons suivi le déroulement de l'hydrolyse d'une solution d'alginate sodique en présence d'un filtrat de culture de la souche F_1 . Le Tableau I montre la variation de la viscosité absolue, de la viscosité spécifique et de la fluidité spécifique de cette solution au cours de 135 minutes d'incubation à 30° C. Ces mesures montrent (Fig. 1) que la dépolymérisation du substrat, d'abord rapide pendant les 60 premières minutes, finit par ralentir et n'être plus mesurable après 120 minutes d'incubation.

Exprimées graphiquement, les variations de la viscosité spécifique et celles de la viscosité absolue en fonction de la durée d'incubation se traduisent par des courbes plus ou moins inflé-

TABLEAU I. — Action hydrolytique des filtrats microbiens F₁ sur une solution d'alginate sodique à 0.1 %, tamponnée à pH 7.2 (KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.1 M), à 30° C.

Durée d'incubation en minutes	Viscosité absolue (η _{abs}) (centipoises)	Viscosité spécifique (η _{sp}) (centipoises)	Fluidité spécifique $\frac{1}{\eta_{sp}} = \Phi_{sp}$
0	1.57 C _p	0.71 C _p	1.40
15	1.35 C _p	0.50 C _p	2
30	1.29 C _p	0.40 C _p	2.50
45	1.23 C _p	0.33 C _p	3
60	1.20 C _p	0.30 C _p	3.33
75	1.17 C _p	0.27 C _p	3.70
90	1.14 C _p	0.24 C _p	4.16
105	1.11 C _p	0.20 C _p	5
120	1.08 C _p	0.16 C _p	6.25
135	1.08 C _p	0.16 C _p	6.25

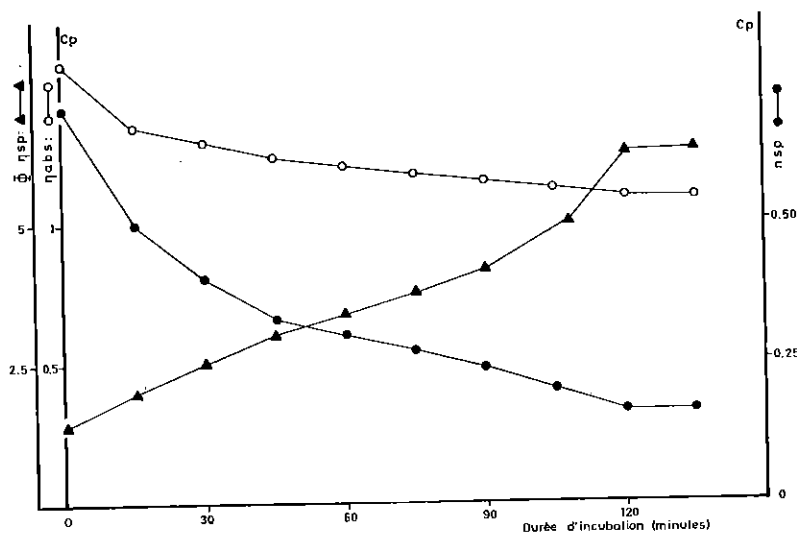


FIG. 1. — Hydrolyse d'une solution d'alginate de soude (0.1 %) à pH 7.2, par un filtrat bactérien F₁.

chies. Par contre, si nous exprimons ces mêmes résultats en fluidité spécifique ($\Phi_{sp} = \frac{1}{\eta_{sp}}$), suivant en cela l'exemple de Levinson et Reese (1950) pour l'étude de l'hydrolyse enzyma-

tique des solutions de... et Malmgren (1947) nous obtenons une... minutes d'incubation... matique peut être re... + b, dans laquelle y n... et x la durée de l'incu...

Le coefficient angu... dérivant la formule p...

Le coefficient angulai... rapport de la variati... la durée de l'incubat...

Activité algi...

Utilisant des conce... pour 40 ml de milieu... d'activité de l'algina... alginolytique est maxi... environs de 7.2 dans le... rons de 7.8 dans le ca...

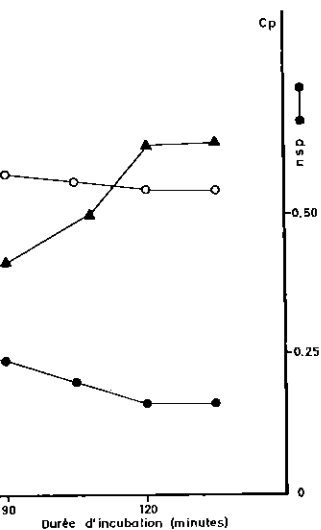
Relation entre la vari...

L'activité alginolyti... de filtrats bactériens F... mesurée au pH opti... mesurées par $\frac{\Delta\Phi_{sp}}{\Delta t}$ (p... temps), pendant les 30... sont exprimées en fonc... nel en extrait enzymati... fluidité spécifique au c... minutes est proportio...

Cette proportionnali... de concentration. En c...

es filtrats microbiens F₁
1 %, tamponnée à pH 7.2
(M), à 30° C.

Fluidité spécifique (η_{sp}) (centipoises)	Fluidité spécifique $\frac{1}{\eta_{sp}} = \Phi_{sp}$
0.71 C _p	1.40
0.50 C _p	2
0.40 C _p	2.50
0.33 C _p	3
0.30 C _p	3.33
0.27 C _p	3.70
0.24 C _p	4.16
0.20 C _p	5
0.16 C _p	6.25
0.16 C _p	6.25



ate de soude (0.1 %) à pH 7.2,

s ces mêmes résultats en
ant en cela l'exemple de
de de l'hydrolyse enzyma-

tique des solutions de carboxyméthylcellulose, ou de Ingelman et Malmgren (1947) pour l'étude des polymétaphosphatases, nous obtenons une droite, du moins pendant les 45 premières minutes d'incubation. Dans ce dernier cas, l'hydrolyse enzymatique peut être représentée par une fonction linéaire $y = ax + b$, dans laquelle y représente la valeur de la fluidité spécifique, et x la durée de l'incubation.

Le coefficient angulaire de cette droite peut être obtenu en dérivant la formule précédente :

$$a = \frac{dy}{dx}$$

Le coefficient angulaire (a) de la droite correspond donc au rapport de la variation de la fluidité spécifique du substrat à la durée de l'incubation.

Activité alginolytique en fonction du pH.

Utilisant des concentrations en filtrats bactériens de 2 ml pour 40 ml de milieu réactionnel, nous avons établi la courbe d'activité de l'alginate en fonction du pH (Fig. 2). L'activité alginolytique est maximum pour une valeur de pH située aux environs de 7.2 dans le cas des filtrats de culture F₁, et aux environs de 7.8 dans le cas des filtrats de culture F₂.

Relation entre la variation de fluidité spécifique et la concentration en enzyme.

L'activité alginolytique d'extraits enzymatiques provenant de filtrats bactériens F₁, utilisés à diverses concentrations, a été mesurée au pH optimum 7.2. Les hydrolyses enzymatiques mesurées par $\frac{\Delta\Phi_{sp}}{\Delta t}$ (perte de fluidité spécifique par unité de temps), pendant les 30 premières minutes d'incubation à 30° C, sont exprimées en fonction de la concentration du milieu réactionnel en extrait enzymatique (Fig. 3). On voit que la variation de fluidité spécifique au cours d'une hydrolyse enzymatique de 30 minutes est proportionnelle à la concentration en enzyme.

Cette proportionnalité ne se vérifie qu'entre certaines limites de concentration. En effet, pour des concentrations en enzyme

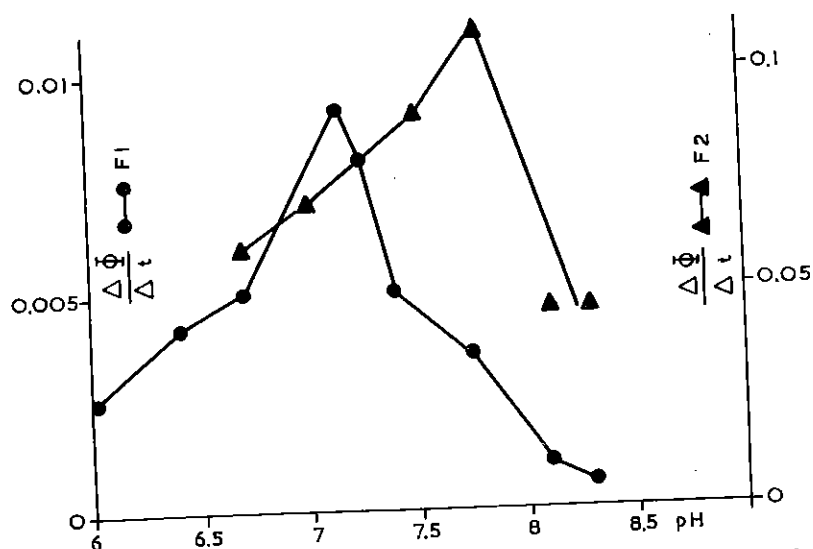


FIG. 2. — Activité de deux alginases bactériennes (F₁ et F₂) en fonction du pH.

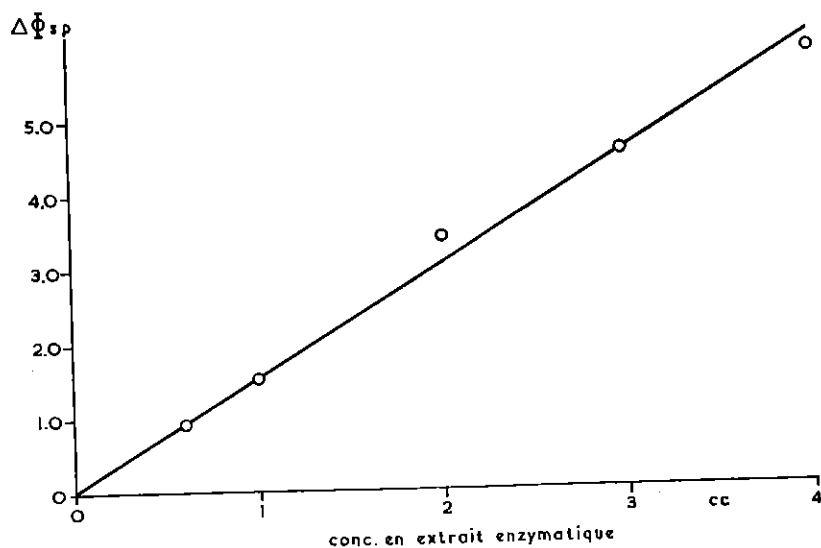


FIG. 3. — Proportionnalité entre la variation de fluidité spécifique (mesurée après une incubation enzymatique de 30 minutes à 30° C) et la concentration en extrait enzymatique (filtrat de culture bactérienne).

produisant après 30 minutes la polymérisation du substrat. L'hydrolyse alginolytique est une fonction de la durée de l'incubation enzymatique peu différente de la fonction linéaire. Il n'y a pas de dépolymérisation pour des valeurs de $\Delta\Phi_{sp}$ supérieur à 0.1.

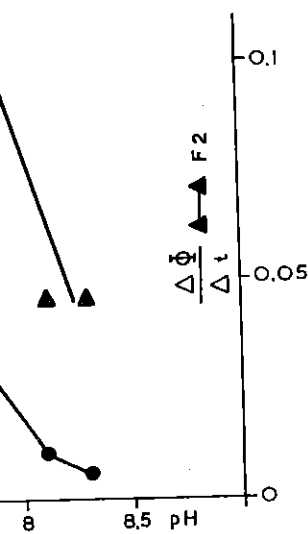
En conclusion, si l'on considère le système de référence, il est possible de diluer les préparations enzymatiques de façon à obtenir une valeur, exprimée en unités alginolytiques, lorsque le substrat utilisé est à 0.1 %.

3. — DÉFINITION D'UNITÉS ALGINOLYTIQUES DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

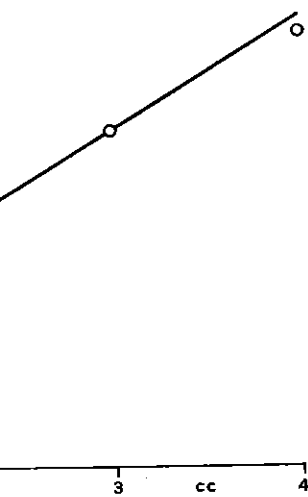
L'hydrolyse enzymatique est mesurée par la variation de la concentration finale de 0.1 %, exprimée par la variation de la fluidité spécifique en fonction de la durée de l'incubation. La concentration en enzyme est constante, dépendant de la variation de fluidité spécifique.

Nous choisissons ce coefficient de fluidité viscosimétrique.

Une unité alginolytique est la quantité d'enzyme nécessaire pour produire une variation de viscosité qui, exprimée en unités alginolytiques, est en fonction de la durée de l'incubation de 30 minutes à 30° C et au



mmes (F₁ et F₂) en fonction du



de fluidité spécifique (mesurée
tes à 30° C) et la concentration
ctérienne).

produisant après 30 minutes d'incubation à 30° C une dépolymérisation du substrat telle que $\Delta\Phi_{sp}$ dépasse la valeur de 6, l'hydrolyse alginolytique, exprimée par la fluidité spécifique en fonction de la durée de l'incubation, n'est plus représentée par une fonction linéaire. Il en va de même si l'on utilise des solutions enzymatiques peu actives, c'est-à-dire qui ne provoquent pas une dépolymérisation du substrat correspondant à un $\Delta\Phi_{sp}$ supérieur à 0.1.

En conclusion, si l'on veut suivre avec exactitude la progression de l'hydrolyse enzymatique et exprimer les résultats dans un système de référence, il convient d'utiliser des extraits enzymatiques dilués de façon à obtenir des activités alginolytiques dont la valeur, exprimée par $\Delta\Phi_{sp}$ soit comprise entre 0.1 et 5, lorsque le substrat utilisé est une solution d'alginate de Na à 0.1 %.

3. — DÉFINITION D'UNITÉS POUR L'EXPRESSION QUANTITATIVE DES ACTIVITÉS ALGINOLYTIQUES.

L'hydrolyse enzymatique de l'alginate de soude (à la concentration finale de 0.1 %, tamponné par $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M) exprimée par la variation de fluidité spécifique du substrat en fonction de la durée de l'incubation est une fonction linéaire de la concentration en enzyme. Le coefficient angulaire de cette droite, dépendant de la concentration de l'enzyme, est égal à la variation de fluidité spécifique par unité de temps.

Nous choisissons ce coefficient pour définir une unité alginolytique viscosimétrique.

Définition.

Une unité alginolytique (en abrégé U. A.) représente la quantité d'enzyme nécessaire pour occasionner une diminution de viscosité qui, exprimée par la variation de fluidité spécifique en fonction de la durée de l'incubation, pendant les 30 premières minutes à 30° C et au pH optimum, est représentée par une

fonction linéaire $y = ax + b$ dont le coefficient angulaire a une valeur de 0.1. Le milieu réactionnel contient, en solution dans de l'eau bidistillée, de l'alginate de soude en concentration finale de 0.1 %, un tampon de phosphates ou tris-HCl (concentration finale 0.1 M) au pH optimum de l'enzyme et la solution enzymatique étudiée. Le volume final du milieu réactionnel est de 40 ml.

CONCLUSIONS.

Nous avons isolé des bactéries alginolytiques à partir de thalles de *Fucus* spp. Parmi les colonies alginolytiques ainsi obtenues, nous avons sélectionné deux souches à croissance rapide sur milieu sélectif. Nous les avons cultivées en milieu de Czapek contenant de l'alginate de soude comme seule source de carbone, les filtrats de ces cultures (recueillis après 7 jours d'incubation à 27° C) furent utilisés comme solution enzymatique.

La mesure viscosimétrique de l'hydrolyse enzymatique de l'alginate de soude permet de doser de très faibles activités enzymatiques. Cependant, différents facteurs (tampon, pH, constante diélectrique du solvant, concentration en sels neutres) peuvent modifier la viscosité du substrat. Cette méthode ne peut donc être utilisée qu'avec précaution et dans des conditions expérimentales rigoureusement contrôlées. Nous avons utilisé des solutions d'alginate de soude (0.1 %) tamponnées par un tampon phosphate ou tris-HCl (concentration finale : 0.1 M).

L'hydrolyse enzymatique mesurée par la variation de fluidité spécifique du milieu réactionnel est une fonction linéaire de la durée de l'incubation pour des concentrations en enzyme comprises entre certaines limites expérimentales. Dans ces conditions, nous avons pu définir une unité alginolytique (U. A.) proportionnelle à la valeur du coefficient angulaire de cette droite

$$\left(a = \frac{\Delta\Phi_{sp}}{\Delta t} \right).$$

Cette méthode rapide, qui peut être utilisée pour la mesure d'activités enzymatiques relativement faibles, se prête particulièrement bien à une recherche de l'alginate dans les sécrétions digestives et les organes de l'appareil digestif des animaux.

Les premiers résultats de la détermination de l'alginate par la mesure de la viscosité (Franssen et Jeuniaux, 1964) a été confirmée par la mesure de la viscosité de cet enzyme dans le milieu réactionnel (Franssen et Jeuniaux, 1964).

- BERNFELD, P., in *Compendium of Marine Microbiology*, ed. by H. S. MASON, N. S. JONES and J. H. J. THOMAS (1962).
- BOLLIGER, R. et MUNGER, H., *Acta Oecologica*, 1, 1, 1 (1962).
- EPPLEY, R. W. et LASKER, R. B., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- FRANSSSEN, J. et JEUNIAUX, Ch., *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 269, 1, 1 (1964).
- GALLI, D. R. et GIESE, A., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- HULTIN, E., *Svensk Havs- och Vattenundersökning*, 1, 1, 1 (1962).
- INGELMAN, B. et MALMGREN, G., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- JEUNIAUX, Ch., *Classe de Sciences Naturelles*, 1, 1, 1 (1964).
- JEUNIAUX, Ch. et FRANSSSEN, J., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- KATSUHIRO, I. et YOSHIDA, K., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- KOOIMAN, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1, 1, 1 (1962).
- LASKER, R. et GIESE, A., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- LEVINSON, H. S. et REE, J. H., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- NORIMASA, J. et KATSUHIRO, I., *Journal of Marine Research*, 22, 1, 1 (1964).
- THJOTTA, T. et KASS, E., *Naturwiss. Kl.*, 5, 1, 1 (1962).

coefficient angulaire a
 el contient, en solution
 e soude en concentration
 tes ou tris-HCl (concen-
 e l'enzyme et la solution
 l du milieu réactionnel

inolytiques à partir de
 nies alginolytiques ainsi
 ux souches à croissance
 ns cultivées en milieu de
 e comme seule source de
 eillis après 7 jours d'incu-
 e solution enzymatique.
 drolyse enzymatique de
 ès faibles activités enzy-
 s (tampon, pH, constante
 en sels neutres) peuvent
 e méthode ne peut donc
 ns des conditions expéri-
 Nous avons utilisé des
 mponnées par un tampon
 finale : 0.1 M).

ar la variation de fluidité
 e fonction linéaire de la
 ntration en enzyme com-
 entales. Dans ces condi-
 ité alginolytique (U. A.)
 at angulaire de cette droite

i peut être utilisée pour la

tivement faibles, se prête
 de l'alginate dans les sécré-
 areil digestif des animaux.

Les premiers résultats d'une enquête expérimentale sur la localisation de l'alginate fait l'objet d'une autre publication (Franssen et Juniaux, 1964) ainsi que la mise en évidence de l'origine tissulaire de cet enzyme chez un Mollusque Gastéropode (Juniaux et Franssen, 1964).

BIBLIOGRAPHIE

- BERNFELD, P., in *Comparative Biochemistry*, (Edited by M. FLORKIN and H. S. MASON), New York and London, Academic Press, 3, 355, (1962).
- BOLLIGER, R. et MUNGEL, K., *Pharm. Acta Helv.*, 33, 141, (1958).
- EPPLEY, R. W. et LASKER, R., *Science*, 129, 214, (1959).
- FRANSSEN, J. et JEUNIAUX, Ch., *Cahiers Biol. Marine*, 5, en cours d'impression, (1964).
- GALLI, D. R. et GIESE, A. C., *J. Exp. Zool.*, 140, 415, (1959).
- HULTIN, E., *Svensk Hemisk Tidskv.*, 60, 131, (1948).
- INGELMAN, B. et MALMGREN, H., *Acta Chem. Scand.*, 1, 422, (1947).
- JEUNIAUX, Ch., *Classe Sci. Acad. Roy. Belgique*, 18, fasc. 7, 47 pp., (1954).
- JEUNIAUX, Ch. et FRANSSEN, J., en cours d'impression, (1964).
- KATSUHIRO, I. et YOSHIKI, A., *Nippon Nôgei-Kagaku-Kaishi*, 30, 742, (1956).
- KOOIMAN, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 338, (1954).
- LASKER, R. et GIESE, A. C., *J. Exp. Biol.*, 33, 542, (1956).
- LEVINSON, H. S. et REESE, E. T., *J. Gen. Physiol.*, 33, 601, (1950).
- NORIMASA, J. et KATSUHIRO, J., *Ann. Rept. Nat. Inst. Nutrition Tokyo*, 65, (1957).
- THJOTTA, T. et KASS, E., *Avhandl. Norske Videnskaps Akad. Oslo Mat. Naturviss. Kl.*, 5, 1, (1945).