

INFLUENCE DES SULFITES SUR LA PROTÉOLYSE : ÉTUDE *IN VITRO*

P. MOUTONNET

avec la collaboration technique de W. LOISEL

*Laboratoire d'Étude des Qualités biologiques des Aliments de l'Homme,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas*

SOMMAIRE

Même à dose élevée, les sulfites n'ont aucune influence sur l'hydrolyse des protéines du lait écrémé en poudre, de la gélatine et du gluten par la pepsine, la trypsine et la peptidase.

En revanche, ils retardent l'hydrolyse enzymatique des protéines du blanc d'œuf cru et, dans une moindre mesure, du blanc d'œuf cuit. Il est possible que cet effet soit dû à une combinaison des sulfites avec les acides aminés soufrés, particulièrement abondants dans les protéines de l'œuf.

INTRODUCTION

L'anhydride sulfureux et quelques-uns des sels qui en dérivent (métabisulfite de potassium, sulfite de sodium) figurent parmi les antiseptiques les plus anciennement employés en technologie alimentaire (DUPUY, 1959 ; CAUSERET, 1960 ; CLUZAN et *al.*, 1965) : on connaît en particulier leurs utilisations en œnologie, en cidrerie, en brasserie, dans l'industrie des jus de fruits, dans le traitement de certains fruits et légumes en vue de leur conservation, etc. ; on sait également que le métabisulfite de sodium peut être employé dans la préparation des ensilages.

Cependant, les effets des sulfites sur l'organisme du consommateur restent insuffisamment connus. Sans insister ici sur les aspects proprement toxicologiques de la question — aspects qui ont été envisagés par CLUZAN et *al.* (1965) —, nous voudrions souligner qu'on ne s'est guère préoccupé jusqu'ici des effets éventuels

de ces substances sur certaines fonctions physiologiques. On peut se demander en particulier si les sulfites, qui exercent un effet inhibiteur sur diverses réactions enzymatiques (DUPUY, 1959), ne risquent pas d'entraver l'action des enzymes digestives.

Il nous a donc paru intéressant d'aborder l'étude de ce dernier problème.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Dans ce mémoire, nous présentons les résultats d'une série d'expériences portant sur l'activité, *in vitro*, de diverses enzymes purifiées (pepsine, trypsine, peptidase) en présence ou en l'absence de sulfites. Différents types de substrats ont été utilisés :

- d'origine animale : lait en poudre écrémé, gélatine, blanc d'œuf ;
- d'origine végétale : gluten.

Caractéristiques des substrats utilisés

L'origine et les caractéristiques des substrats utilisés sont indiquées dans le tableau 1.

TABLEAU I

Origine et caractéristiques des différents substrats

| Substrats | Traitements | Teneur en protéines (%) | Teneur en eau (%) |
|----------------------------|--|-------------------------|-------------------|
| Poudre de lait écrémé..... | Atomisation | 37,7 (N × 6,39) | — |
| Gélatine (N.B.C.) | — | 99,3 (N × 6,25) | — |
| Blanc d'œuf : | | | |
| N.B.C..... | Atomisation | 78,7 (N × 6,25) | 6,0 |
| Gallia | Atomisation | 80,7 (N × 6,25) | 6,3 |
| Éch. laboratoire n° 1.... | Séchage à 50°C ⁽¹⁾ | 86,6 (N × 6,25) | 2,9 |
| Éch. laboratoire n° 2.... | Lyophilisation ⁽²⁾ | 81,2 (N × 6,25) | traces |
| Éch. laboratoire n° 3.... | Cuisson et lyophilisation ⁽²⁾ | 84,0 (N × 6,25) | traces |
| Gluten (N.B.C.) | — | 73,0 (N × 5,70) | — |

⁽¹⁾ Le blanc d'œuf est traité par l'alcool à 95° (2 volumes d'alcool pour 1 volume de blanc d'œuf). Le coagulum est filtré sur büchner, séché sous vide à l'étuve à 50°C, puis pulvérisé au broyeur à bille.

⁽²⁾ Le blanc d'œuf est battu en neige, puis on prépare deux échantillons :

n° 2 — échantillon « cru » : lyophilisé immédiatement.

n° 3 — échantillon « cuit » : le blanc battu est passé au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes avant la lyophilisation.

Pour les deux types de préparation, la lyophilisation est réalisée sur plateaux pendant 24 heures.

Les produits secs sont mis en poudre au mixer.

Techniques d'hydrolyse

L'hydrolyse porte sur des échantillons de 2 g (poudre de lait) ou de 1 g (tous les autres substrats). Ces prises sont introduites dans des matrass et on ajoute à une partie d'entre elles :

- soit du métabisulfite de potassium à la dose de 50 ou de 250 mg par gramme de poudre ;

— soit du sulfite de sodium à la dose de 100 mg par gramme de poudre (1).

Deux hydrolyses successives sont pratiquées sur chaque échantillon, les matras étant plongés dans un bain-marie à $40^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ avec agitation permanente (système électromagnétique) :

1. Hydrolyse pepsique de 30 minutes portant sur les 1 ou 2 g de substrat dissous dans 25 ml d'HCl N/10 contenant la pepsine (2) à 0,20 p. 100 (pH env. 1,8).

2. Hydrolyse trypsique de 6 heures, après neutralisation par la soude 0,2 N. En ce qui concerne ce deuxième stade, il y a deux séries différentes :

— avec 15 ml de tampon phosphaté 0,1 M contenant la trypsine (3) à 0,25 p. 100 ;

— avec 15 ml de tampon phosphaté 0,1 M contenant la trypsine à 0,25 p. 100 et la peptidase (4) à 0,40 p. 100.

Pour chaque prélèvement — au temps t — les hydrolysats sont soumis à une ébullition de 15 minutes au bain-marie, pour assurer à la fois l'arrêt de l'hydrolyse et la dénaturation des protéines restantes. Les prélèvements sont ensuite centrifugés (15 minutes à 4 000 g).

Dosage de l'azote aminé

L'azote aminé total est dosé par la méthode de MICHEL (1960) (réaction à la ninhydrine, puis microdiffusion d'ammoniac dans des cellules de Conway).

Il est à signaler que l'utilisation d'autres techniques de dosage du N (NH_2) avait d'abord été envisagée sans succès :

1. Par spectrophotométrie à 280 m μ où tryptophane, cystéine, phénylalanine absorbent (LOWY et al., 1958) : en principe, la mesure de la densité optique à cette longueur d'onde permet donc de suivre la cinétique d'hydrolyse enzymatique. Mais, dans le cas présent, le sulfite réagit avec la cystéine pour donner finalement un complexe qui absorbe à 267 m μ (DUPUY, 1959). D'où impossibilité totale de mesure.

2. Par méthode manométrique de VAN SLYKE à l'acide nitreux (VAN SLYKE, 1911). Au cours de la réaction, l'anhydride sulfureux fixé est libéré avec l'azote et interfère dans le dosage.

RÉSULTATS

Les résultats réunis dans les tableaux 2 et 3 sont exprimés en milligrammes de N (NH_2) par gramme de protéines.

1. On voit que, dans le cas du *lait*, de la *gélatine* et du *gluten*, les différences observées entre les échantillons hydrolysés en présence de sulfite et les échantillons témoins sont généralement minimales : le calcul statistique, par la méthode du t de Student, montre qu'elles ne sont jamais significatives. On peut donc considérer que, dans les conditions d'expérience adoptées, les sulfites n'ont pas d'effet sur la protéolyse des trois substrats.

2. Il n'en est pas de même dans le cas du *blanc d'œuf*, dont l'azote aminé est libéré plus lentement lorsque l'hydrolyse est réalisée en présence de sulfite.

Avec les deux échantillons du commerce (N.B.C., Gallia) et le blanc d'œuf cru lyophilisé (échantillon laboratoire n° 2), les différences entre produit ayant subi

(1) Rapportées au gramme de protéines, les doses de SO_2 utilisées atteignent en moyenne respectivement 65 mg et 360 mg pour le métabisulfite de potassium, 130 mg pour le sulfite de sodium. Or, dans la ration d'un homme adulte ingérant 80 g de protéines et consommant 1 l de vin sulfité à la dose licite maximum (350 mg de SO_2 par litre), la correspondance serait de 4,4 mg de SO_2 par gramme de protéines. Quelles que soient les réserves que l'on peut opposer à cette comparaison, les doses de SO_2 utilisées dans notre expérience apparaissent donc comme élevées.

(2) Pepsine 1/10 000 Difco.

(3) Trypsine 1/250 Difco.

(4) Peptidase — « Porcine intestinale — C Grade » — Calbiochem.

l'action du sulfite et produit ne l'ayant pas connue sont, à tous les stades de prélèvement, significatives au seuil de 0,01.

Avec l'albumine d'œuf obtenue par précipitation à l'alcool à 95° et séchage ménagé à l'étuve (échantillon laboratoire n° 1), et le blanc d'œuf cuit lyophilisé, les différences entre produit hydrolysé en présence de sulfite et produit témoin sont :

— significatives au seuil de $P = 0,05$ pour les prélèvements P_1 (fin de l'attaque pepsique), T_1 (5 minutes d'hydrolyse trypsique) et T_2 (30 minutes d'hydrolyse trypsique) ;

— non significatives pour la suite.

Pour savoir à quel stade de la protéolyse se situe l'action du sulfite, une série d'hydrolyses sur le blanc d'œuf cru lyophilisé (échantillon laboratoire n° 2) a été réalisée en introduisant le sulfite :

— soit avant l'attaque pepsique ;

— soit aussitôt après, en même temps que la trypsine et la peptidase.

La figure 1 montre que l'action du sulfite se situe au niveau de l'attaque pep-

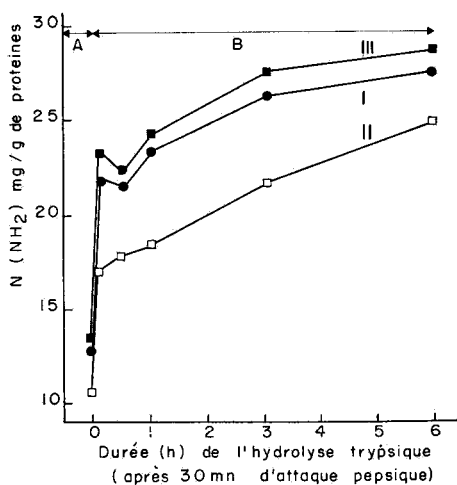


FIG. 1. — Effets du sulfite de sodium sur l'attaque pepsique et sur l'hydrolyse « trypsine-peptidase » du blanc d'œuf cru lyophilisé.

- I. Échantillon témoin.
 II. Échantillon additionné de sulfite de sodium (100 mg par g de substrat) avant l'attaque pepsique.
 III. Échantillon additionné de sulfite de sodium (à la même dose) après l'attaque pepsique.
 (Période A : attaque pepsique. Période B : hydrolyse trypsique).

sique. A chaque stade des prélèvements, les différences observées entre échantillon témoin et échantillon additionné de sulfite dès le début de l'attaque pepsique sont significatives au seuil de $P = 0,01$. Mais elles ne le sont pas entre échantillon témoin et échantillon additionné de sulfite après l'attaque pepsique.

Le retard de l'hydrolyse trypsique observé en présence de sulfite semble résulter uniquement d'une attaque pepsique moins poussée.

DISCUSSION

1. On peut s'étonner du faible pourcentage d'hydrolyse : après 6 heures d'attaque par la trypsine, l'azote aminé libéré correspond approximativement à 20 p. 100 de l'azote total dans le cas du lait, de la gélatine et du blanc d'œuf, à 30 p. 100 dans le cas du gluten.

Quelques essais, effectués sur le lait, ont montré qu'il était possible d'améliorer ce pourcentage en prolongeant la durée de l'attaque tryptique : mais, après 25 heures, il n'atteignait encore que 32 p. 100 (1). Compte tenu du fait que nous nous intéressons surtout à la comparaison de vitesses d'hydrolyse, cette amélioration ne nous a pas semblé suffisante pour justifier le prolongement systématique de l'attaque tryptique au-delà de 6 heures.

L'utilisation de la peptidase accroît la vitesse de l'hydrolyse tryptique du lait : en 6 heures, elle fait passer le pourcentage d'azote aminé libéré à 26 p. 100 (au lieu de 20 p. 100). Mais, elle est apparemment sans action lorsque le substrat est la gélatine, le blanc d'œuf ou le gluten.

D'autre part, nous avons constaté que l'addition d'ions Mn^{++} est sans effet avec tous les substrats.

En fait, le contraste entre la lenteur de l'hydrolyse tryptique dans nos essais et sa plus grande rapidité dans ceux d'autres auteurs est probablement plus apparent que réel. En effet, la méthode de MICHEL pour le dosage de l'azote aminé ne rend compte que de N (NH_2) libre. D'autres méthodes, comme celle de VAN SLYKE (non utilisée dans ce travail pour des raisons qui ont été indiquées plus haut), dosent l'azote de petits peptides en même temps que l'azote aminé libre.

Comme l'a observé MICHEL (1960), la plus ou moins grande spécificité des méthodes employées pour le dosage de l'azote aminé peut expliquer bien des divergences expérimentales. Les résultats que nous avons obtenus en déterminant l'azote aminé par plusieurs méthodes au cours de l'hydrolyse tryptique de la poudre de lait en fournissent une nouvelle preuve (tabl. 4). Bien que l'allure générale des différentes courbes obtenues soit la même, on voit que la signification d'une valeur expérimentale isolée est très limitée. Le principal intérêt des dosages d'azote aminé dans un liquide d'hydrolyse est de permettre de suivre le progrès de cette hydrolyse au cours du temps, et surtout de comparer la cinétique du phénomène dans différentes conditions expérimentales : ce qui était le cas ici.

Il y a lieu enfin de souligner que les acides aminés libérés ont probablement une action inhibante sur l'hydrolyse enzymatique. On améliorerait donc peut-être les résultats en réalisant une dialyse continue des produits formés (MAURON *et al.*, 1955). Mais il faudrait veiller alors à maintenir constante la concentration du milieu en sulfites.

2. Il n'est pas sans intérêt de souligner que la cinétique de la protéolyse est sensiblement la même pour tous les substrats utilisés, à l'exception du gluten (tabl. 2 et 3). Dès la fin de l'attaque pepsique, la quantité de N (NH_2) libérée à partir de ce substrat est particulièrement élevée ; l'hydrolyse tryptique est plus rapide aussi que celle du lait, de la gélatine ou du blanc d'œuf.

(1) Pour les hydrolyses de longue durée, une couche de toluène a permis d'éviter contaminations et fermentations à l'intérieur des matras.

TABLEAU 2

Azote aminé libéré au cours de l'hydrolyse « pepsine-trypsine » de différents substrats, en l'absence ou en présence de sulfites
(Chaque valeur correspond à la moyenne de 4 déterminations)

| Conditions et durée d'hydrolyse ⁽¹⁾ | Azote aminé libéré en mg N (NH ₂) par g de protéines initiales | | | | | | | |
|--|--|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | Lait écrémé | Gélatine | Blanc d'œuf N.B.C. ⁽²⁾ | Blanc d'œuf Gallia ⁽²⁾ | Blanc d'œuf Labo. n° 1 ⁽²⁾ | Blanc d'œuf Labo. n° 2 ⁽²⁾ | Blanc d'œuf Labo. n° 3 ⁽²⁾ | Gluten |
| <i>Sans sulfite</i> | | | | | | | | |
| P | 9,7 | 12,1 | 42,4 | 43,3 | 43,2 | 42,9 | 42,8 | 27,0 |
| T ₁ | 23,7 | 20,4 | 49,8 | 20,7 | 21,2 | 20,3 | 19,6 | 42,8 |
| T ₂ | 24,7 | 23,8 | 22,7 | 24,3 | 23,8 | 23,1 | 20,8 | 46,8 |
| T ₃ | 27,6 | 24,4 | 24,7 | 23,7 | 26,4 | 24,3 | 23,3 | 47,5 |
| T ₄ | 30,4 | 27,7 | 29,0 | 27,1 | 30,2 | 28,7 | 29,0 | 53,2 |
| T ₅ | 33,1 | 28,1 | 31,0 | 30,4 | 33,7 | 29,3 | 31,8 | 55,2 |
| <i>Avec sulfite</i> | | | | | | | | |
| P | 10,8 | ⁽⁵⁾ 41,9 | ⁽⁵⁾ 9,7 | ⁽⁵⁾ 9,6 | ⁽⁵⁾ 41,3 | ⁽⁵⁾ 7,9 | ⁽⁵⁾ 9,5 | ⁽⁵⁾ 30,4 |
| T ₁ | 22,5 | 19,5 | 16,3 | 14,1 | 17,1 | 16,2 | 16,3 | 46,2 |
| T ₂ | 25,5 | 24,2 | 20,3 | 17,8 | 21,8 | 16,8 | 20,2 | 48,2 |
| T ₃ | 27,4 | 24,5 | 21,1 | 20,9 | 23,8 | 18,4 | 22,8 | 50,0 |
| T ₄ | 30,6 | 27,1 | 23,4 | 22,5 | 30,8 | 20,3 | 27,8 | 54,7 |
| T ₅ | 32,2 | 28,8 | 27,1 | 24,9 | 35,4 | 24,5 | 32,8 | 55,7 |

⁽¹⁾ P : après attaque pepsique (30 mn) ;

T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ : après attaque pepsique (30 mn) suivie d'une hydrolyse trypsique de 5 mn, 30 mn, 1 h, 3 h, 6 h.

⁽²⁾ Un ou deux astérisques signifient que la différence entre les résultats obtenus en l'absence de sulfite et en présence de sulfite est significative, au seuil de 0,01 ou 0,05 respectivement.

⁽³⁾ 50 mg de métabisulfite de potassium par g de substrat.

⁽⁴⁾ 250 mg de métabisulfite de potassium par g de substrat.

⁽⁵⁾ 100 mg de sulfite de sodium par g de substrat.

Il serait intéressant de développer l'étude de cet aspect du problème et de chercher quelle peut être sa portée pratique.

TABLEAU 3

Azote aminé libéré au cours de l'hydrolyse « pepsine-trypsine + peptidase de différents substrats, en l'absence ou en présence de sulfites.

(Chaque valeur corespond à la moyenne de 4 déterminations)

| Conditions et durée d'hydrolyse (1) | Azote aminé libéré en mg N (NH ₂) par g de protéines initiales | | | | | |
|-------------------------------------|--|------|------|----------|------------------------|--------|
| | Lait écrémé | | | Gélatine | Blanc d'œuf N.B.C. (2) | Gluten |
| <i>Sans sulfite</i> | | | | | | |
| P | 10,1 | | | 12,3 | 11,1 | 25,6 |
| T ₁ | 25,5 | | | 22,5 | 20,4 | 42,3 |
| T ₂ | 27,6 | | | 24,8 | 24,2 | 44,8 |
| T ₃ | 35,0 | | | 25,5 | 25,1 | 49,9 |
| T ₄ | — | | | 28,1 | 30,2 | 50,7 |
| T ₅ | 41,1 | | | 29,6 | 32,1 | 50,4 |
| <i>Avec sulfite</i> | | | | | | |
| | (3) | (4) | (5) | (6) | (6) | (6) |
| P | 8,7 | 8,7 | 8,4 | 12,4 | 8,1 * | 27,3 |
| T ₁ | 26,5 | 26,8 | 26,8 | 22,7 | 17,2 * | 42,3 |
| T ₂ | — | — | — | 23,8 | 19,4 * | 45,2 |
| T ₃ | 35,8 | 35,8 | 31,0 | 24,7 | 21,5 * | 48,2 |
| T ₄ | — | — | — | 28,7 | 25,1 * | 47,1 |
| T ₅ | 39,8 | 40,8 | 41,2 | 29,3 | 29,3 * | 54,1 |

(1) P : après attaque pepsique (30 mn) ;

T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ : après attaque pepsique (30 mn) suivie d'une hydrolyse tryptique de 5 mn, 30 mn, 1 h, 3 h, 6 h.

(2) Un astérisque signifie que la différence entre les résultats obtenus en l'absence et en présence de sulfite est significative, au seuil de 0,01.

(3) 50 mg de métabisulfite de potassium par g de substrat.

(4) 250 mg de métabisulfite de potassium par g de substrat.

(5) 100 mg de sulfite de sodium par g de substrat.

3. S'il n'est pas possible d'expliquer de manière certaine pourquoi les sulfites retardent l'hydrolyse des protéines d'œuf, mais non celle des autres substrats utilisés, on peut néanmoins émettre une hypothèse.

Une différence essentielle entre les protéines du blanc d'œuf et les autres substrats est la teneur plus élevée des premières en acides aminés soufrés :

Acides aminés (g pour 100 g d'azote)

| | Cystine | Méthionine | Total |
|-------------------|---------|------------|-------|
| Lait | 0,9 | 2,6 | 3,5 |
| Blanc d'œuf | 2,7 | 3,8 | 6,5 |
| Gélatine | 0,1 | 0,8 | 0,9 |
| Gluten | 2,1 | 1,4 | 3,5 |

Elles sont donc particulièrement riches en liaison S—S ou —SH qui réagissent avec SO_3^- pour donner —S— SO_2 .

TABLEAU 4

Dosage de l'azote aminé par différentes méthodes, après hydrolyse pepsique et trypsique du lait écrémé en poudre

| Durée de l'hydrolyse : — pepsique : P — trypsique : T | Dosage de l'azote aminé selon : | | |
|---|--|---|--|
| | Méthode MICHEL sur échant. déprotéinés par ébullition suivie de centrifugation. (mg N (NH_2) par g de protéines initiales) | Méthode MICHEL sur échant. déprotéinés à l'alcool à 95° (mg N (NH_2) par g de protéines initiales) | Méthode VAN SLYKE à l'acide nitreux (mg N (NH_2) par g de protéines initiales) |
| P = 30 mn | 9,7 | 5,3 | — |
| T ₁ = 5 mn | 23,7 | 11,7 | 53,0 |
| T ₂ = 30 mn | 24,7 | 17,7 | 53,4 |
| T ₃ = 1 h | 27,6 | 17,2 | 56,8 |
| T ₄ = 3 h | 30,4 | 21,5 | 58,8 |
| T ₅ = 6 h | 33,0 | 21,7 | 62,6 |

N.B — Ces valeurs correspondent à la moyenne obtenue à partir de 4 expériences successives.

Ce serait la liaison—S— SO_2 qui générerait l'évolution normale de l'hydrolyse enzymatique du blanc d'œuf *cru*. Par contre, dans le blanc *cuit* ou *dénaturé* à l'alcool, les liaisons S—S ou —SH sont dégradées partiellement et n'entreraient plus en réaction avec SO_3^- : d'où une cinétique enzymatique différente.

C'est d'ailleurs une hypothèse du même type (formation de complexes entre sulfite et groupements —SH) que DUPUY (1959) émet pour expliquer l'inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*.

Reçu pour publication en octobre 1966.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos vifs remerciements à MM. G. FAUCONNEAU, R. PION et M.-C. MICHEL pour leurs précieux conseils.

SUMMARY

INFLUENCE OF SULPHITES ON PROTEOLYSIS : STUDIES « IN VITRO »

The author studied the influence of certain sulphites on the hydrolysis of different substrates by pepsin, trypsin and peptidase. Potassium metabisulphite was added as 50 or 250, and sodium sulphite as 100 mg per g substrate. Free amino nitrogen was estimated by the method of MICHEL (Reaction with ninhydrin then micro-diffusion of ammonia in the cells of CONWAY.)

In these conditions the sulphites did not have any effect on the rate on hydrolysis of the proteins of skimmed milk powder, gelatin or gluten. They did slow down the hydrolysis of egg white, particularly if raw ; with cooked egg white the effect was less marked. It seemed that the retarding action of the sulphites exerted itself on the development of the attack by pepsin ; the effect was not seen if the sulphite was added to the egg white only at the start of trypsin hydrolysis.

It is possible that the particular behaviour of egg white proteins may be due to their richness in sulphur amino acids. In effect, the S-S or -SH bonds react with SO_3^{--} to give -S-SO₂ bonds which can hinder the development of hydrolysis.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CAUSERET J., 1960. Répercussions hygiéniques et nutritionnelles de quelques traitements de stabilisation des boissons. *Diét. Nutrit.*, 41-51.
- CLUZAN R., CAUSERET J., HUGOT D., 1965. Le métabisulfite de potassium : étude de toxicité à long terme sur le Rat. *Ann. Biol. anim., Bioch., Biophys.*, 5, 267-281.
- DUPUY P., 1959. L'inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol. agric.*, 8, 233-283 et 337-376.
- LOWY R., BRIGAND L., TRÉMOLIÈRES J., 1958. Intervention de divers types d'amidon dans la vitesse de digestion des protéines. *Ann. Nutrit. Alim.*, 12, 51-59.
- MICHEL M. C., 1960. Technique de microdosage de l'azote α -aminé : dosage de l'azote aminé dans quelques liquides biologiques. *Aminoacides, peptides, protéines*. Cahier n° 4, 63-71, A. E. C., Commeny.
- VAN SLYKE D., 1911. *J. biol. Chem.*, 4, 3.
-