



Etude de l'action des ultrasons cavitants sur quelques enzymes coagulantes

C. Raharintsoa, M. L. Gaulard, C. Alais

► To cite this version:

C. Raharintsoa, M. L. Gaulard, C. Alais. Etude de l'action des ultrasons cavitants sur quelques enzymes coagulantes. *Le Lait*, 1977, 57 (569_570), pp.631-645. <hal-00928775>

HAL Id: hal-00928775

<https://hal.science/hal-00928775v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Étude de l'action des ultrasons cavitants sur quelques enzymes coagulantes

par

C. RAHARINTSOA*, M. L. GAULARD** et C. ALAIS*

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, on s'inquiète des conséquences que peut avoir l'emploi des ultrasons sur la matière vivante. De nombreuses recherches ont été effectuées, entre autres sur les enzymes : lactate déshydrogénase, ribonucléase, pepsine, chymosine, chymotrypsine, trypsine, aldolase, ainsi que sur l'activité enzymatique [1, 2, 3, 4, 5]. Tous ces travaux montrent l'influence de la fréquence ultrasonore, de l'intensité, de la durée d'exposition, mais aussi l'influence de la concentration enzymatique et celle de la nature du milieu de dilution.

Parmi tous ces paramètres, le rôle de l'intensité ultrasonore semble primordial. En deçà d'un certain seuil correspondant à l'apparition du phénomène de cavitation, les ultrasons ne paraissent pas avoir d'action sur l'activité enzymatique. Au delà de ce seuil, des destructions progressives apparaissent qui sont d'autant plus importantes que la durée d'exposition est plus longue. Il n'a pas encore été clairement dit si ces destructions sont dues, d'abord, aux variations brutales de pression provoquées par la cavitation, ou plutôt à des effets secondaires tels que l'existence de pointes de température très brèves et très intenses ou la formation de radicaux libres.

Il nous a paru intéressant d'entreprendre une étude systématique de l'action des ultrasons cavitants sur quelques enzymes coagulant le lait, dont les propriétés moléculaires et catalytiques font l'objet de recherches au Laboratoire de Biochimie Appliquée : chymosine (ren-

* Laboratoire de Biochimie Appliquée.

** Laboratoire d'Electronique.

Université de Nancy I, case officielle 140 - F. 54037 Nancy cedex.

nin), pepsine, protéases coagulantes fongiques d'*Endothia parasitica*, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, espérant, par là, obtenir quelques informations nouvelles et sur les enzymes étudiées et sur la cavitation proprement dite [6, 7].

Dans cet article, nous nous attacherons surtout à étudier l'action des ultrasons cavitants sur les enzymes en éprouvant leur activité coagulante, avant et après traitement, nous réservant d'étudier, par la suite, l'action des ultrasons sur la coagulation du lait proprement dite.

MATERIEL ET METHODES

1. Dispositif ultrasonore

C'est une cuve en acier inoxydable NS 22 S, de 4 cm de diamètre et de 7 cm de hauteur, dont le fond est constitué par un triplet de type Langevin, qui assure l'excitation ultrasonore. La fréquence de résonance de ce triplet est de 27 KHz. Les parois latérales de la cuve comportent un manchon qui permet une circulation d'eau, assurant le refroidissement de la substance à étudier mise à l'intérieur de la cuve (fig. 1). Un générateur basse fréquence, suivi d'un amplificateur

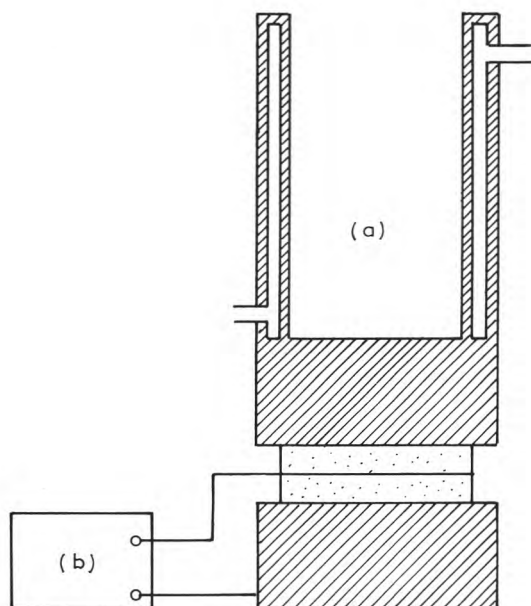


fig. 1

Coupe schématique de la cellule d'irradiation ultrasonore : (a) cuve, (b) alimentation.

permet d'amener une tension pouvant aller jusqu'à 400 volts crête-crête au triplet ultrasonore ; elle permet d'obtenir facilement le phénomène de cavitation à l'intérieur de la cuve. En effet, le régime de cavitation est atteint lorsque l'amplitude de la tension appliquée au triplet est telle qu'elle provoque, à l'intérieur du milieu à étudier, des variations de pression dont l'amplitude est supérieure à la pression d'équilibre liquide-vapeur, à la température de ce milieu. Durant la demi-alternance négative de variation de pression de l'onde ultrasonore, il y a formation de petites cavités, remplies de vapeur, cavités qui sont susceptibles d'exploser durant la demi-alternance positive suivante.

L'explosion de ces petites cavités est un phénomène violent et encore mal connu : ondes de choc accompagnées localement et instantanément par des pointes de pression et de température très élevées, et par des possibilités de réactions chimiques secondaires. Parmi ces réactions, la production de radicaux libres H^+ et OH^- et la formation de H_2O_2 a été mise en évidence depuis déjà longtemps [8]. La présence d'eau oxygénée ayant été donnée comme responsable de la destruction de nombreux micro-organismes, nous nous attachons tout spécialement à l'étude de ce paramètre.

2. Dosage de l'eau oxygénée

Nous utilisons la technique colorimétrique de Chapon *et al.* [9] ; l'eau oxygénée, comme tous les peroxydes, est stable dans une solution renfermant de l'acide ascorbique et du leucobleu de méthylène (BMH_2). En présence d'un catalyseur à fonction peroxydasique, telle que la peroxydase, elle se décompose très rapidement, libérant de l'oxygène actif qui est transféré sur l'acide ascorbique et sur le BMH_2 assurant son oxydation. La concentration maximale de bleu de méthylène (BM) ainsi produit est accessible par colorimétrie et elle est proportionnelle à la quantité de H_2O_2 mise en œuvre. Nous donnons, figure 2, la courbe obtenue avec de l'eau distillée pour des durées croissantes du temps d'irradiation ultrasonore. Avec la durée, nous voyons croître régulièrement la hauteur du pic qui caractérise, dans la cuve de mesure, l'apparition du bleu de méthylène résultant de la décomposition de H_2O_2 . Après réduction du BM par l'acide ascorbique, la courbe revient à son point de départ.

3. Les enzymes

Chymosine (ou rennin) EC 3 4 23 4, protéase acide extraite de la cailllette de veau, exempte de pepsine. Nous avons utilisé une préparation de Chr. Hansen, en poudre dont l'activité en unités internationales (UI) est de 100 000, ce qui correspond à 457 unités présures par gramme selon Berridge [10].

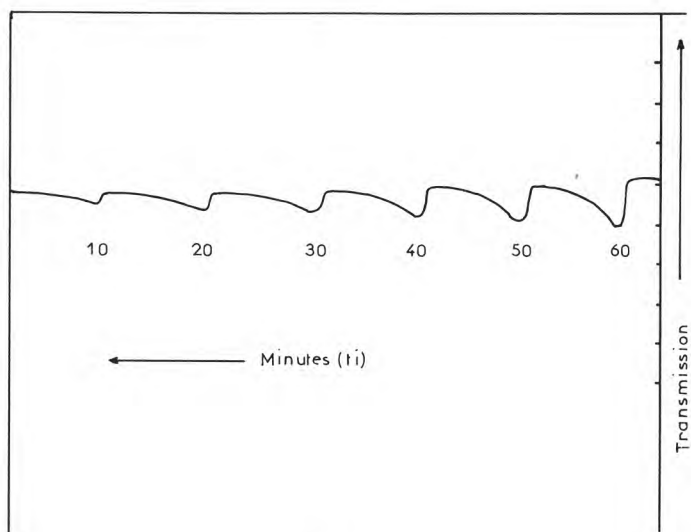


fig. 2

Diagramme du dosage colorimétrique de l'eau oxygénée.

Pepsine, EC 3 4 23 1, protéase acide sécrétée dans l'estomac des mammifères. Nous avons utilisé une préparation en poudre de pepsine porcine Sigma P 7 000.

Enzyme de *Endothia parasitica* (Ep), moisissure parasite du châtaigner ; la préparation de Ch. Pfizer (Suparen) est une poudre brune dont l'activité est de 200 000 UI.

Enzyme de *Mucor miehei*, moisissure thermophile banale du sol ; nous avons utilisé deux préparations :

— « Rennilase », de Novo-Industri, qui utilise la souche CBS 37 065, se présentant sous forme d'un liquide brun dont l'activité est de 14 000 UI ;

— « Fromase » de Rapidase S.A., qui utilise la souche NRRL 3 169, sous forme de poudre jaune d'activité 100 000 UI.

Enzyme de *Mucor pusillus* (Mp), moisissure mésophile banale du sol, exploitée par Meito Sangyo, poudre brune d'activité 220 000 UI.

L'irradiation a été appliquée à des solutions des enzymes brutes dans l'eau distillée à des concentrations indiquées dans le tableau 1. On a également appliqué l'irradiation aux mêmes enzymes après une purification par une longue dialyse contre l'eau à 4° C, suivie d'une dessiccation par lyophilisation.

TABLEAU 1
Concentration et activités enzymatiques

Enzyme	Concentration (p. 100)		Activité relative**	
	solution irradiée	dans le lait*	avant dialyse	après dialyse
Chymosine (brute)	0,2			
Chymosine (brute)	0,4	0,02	100	1 250
Chymosine (brute)	1,0			
Pepsine porcine	0,2	0,0012	1 650	4 150
Enzyme Ep	0,2	0,0056	350	2 000
Enzyme Mm (Ren)	2,0	0,107	19	310
Enzyme Mm (Fro)	0,2	0,017	120	830
Enzyme Mp	0,2	0,006	330	1 250

* Concentration coagulant le lait reconstitué à pH 6,5 et à 32° C en 5 mn, avant irradiation.

** La présure en poudre industrielle (chymosine brute) est prise comme référence : son activité reconnue est de 100 000 UI.

Des essais parallèles d'irradiation de la chymosine ont été effectués dans une solution de tampon phosphate 0,05 M, pH 6,03 ; de tampon citrate 0,05 M, pH 6,08 ; de pyridine 0,05 M, pH 6,07 et dans des solutions de sérum albumine bovine à 0,5 p. 100 ou de protéines du lactosérum ou « séro-protéines » à 0,5 p. 100, le pH étant proche de 6,0.

4. Mesure de l'activité coagulante

Les doses d'enzymes utilisées donnent un temps de coagulation proche de 5 mn, avant irradiation.

Les temps de coagulation sont déterminés au bain-marie à 32° C, dans des tubes à essais contenant 10 ml de lait ; c'est le temps s'écoulant entre le moment de l'addition de l'enzyme en solution et l'apparition de flocons sur la paroi du tube incliné, subissant un lent mouvement de rotation. Le lait utilisé est un lait reconstitué à partir de lait en poudre de qualité « Low heat » que l'on dissout dans une solution de CaCl_2 , 0,003 M, à la concentration de 12 g pour 100 ml ;

le pH est 6,5. L'aptitude à la coagulation est comparable à celle d'un lait frais de grand mélange.

5. Chromatographie d'exclusion

Nous avons fait un « tamisage moléculaire » sur Séphadex « G 100 fine » de Pharmacia, dont le domaine de fractionnement de peptides et de protéines globulaires est de 4 000 à 150 000 avec une colonne type chromaflex de 1 m de hauteur et de 2,5 cm de diamètre. Le tampon d'élution est le phosphate sodique 0,1 M, pH 7,0. Le débit de 26 ml/h est réglé par une pompe péristaltique. Des fractions de 3 ml sont recueillies sur un collecteur volumétrique « Isco ». La densité optique de chaque fraction est ensuite mesurée à 280 nm dans un spectrophotomètre Acta II Beckman. On sait que le volume d'élution des protéines globulaires est approximativement une fonction linéaire du logarithme des masses moléculaires.

Les protéines d'étalonnage sont des solutions à 0,2 p.100 dans le tampon d'élution de β -lactoglobuline (MM 36 000), chymotrypsine (MM 25 000), α -lactalbumine (MM 14 200).

6. Séroprotéines

Elles sont préparées à partir du sérum de lait écrémé acidifié à pH 4,6. Après une longue dialyse contre l'eau à 4° C, les protéines sèches sont obtenues par lyophilisation.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Action des ultrasons sur la chymosine en solution aqueuse en fonction de la dilution

Les courbes sont représentées sur la figure 3, pour des solutions aqueuses d'enzymes à 0,2 p.100, 0,4 p.100 et 1 p.100 et pour des durées d'irradiation ultrasonore allant de 10 mn à 1 h.

Nous constatons que pour une dilution donnée la destruction de la chymosine est d'autant plus importante que le temps d'irradiation ultrasonore est plus long. Beck et Rouyer [11] ont fait la même observation avec une seule dilution de chymosine.

La destruction de l'enzyme croît avec la dilution. En effet, pour une solution aqueuse à 0,2 p.100 l'enzyme devient à peu près inactif au bout de 1 h, alors qu'à la concentration de 1 p.100 la diminution de l'activité est très limitée. Cette influence de la dilution est conforme à celle notée par d'autres chercheurs travaillant sur d'autres milieux [12, 13].

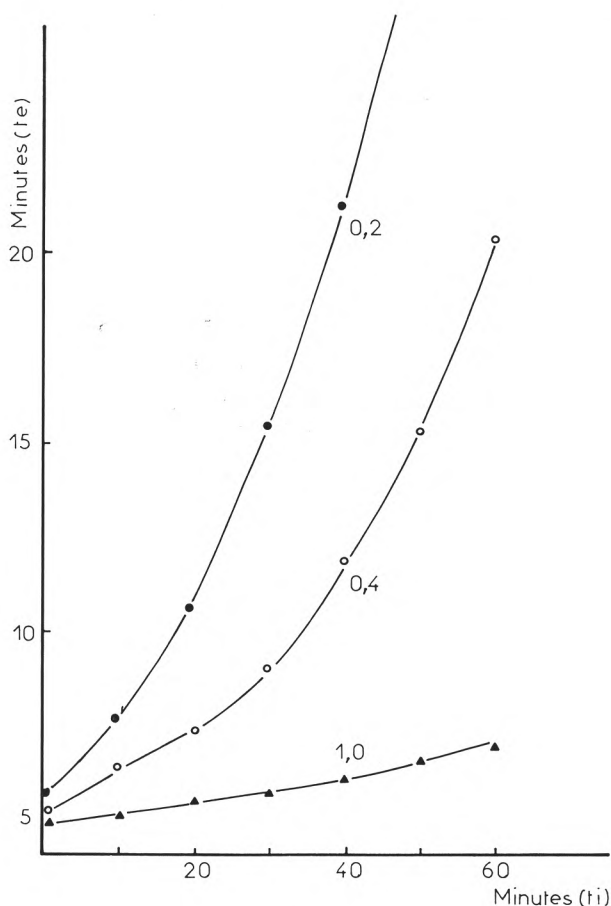


fig. 3

Activité coagulante des solutions aqueuses de chymosine soumises à l'irradiation ultrasonore :

Concentration en enzymes : 0,2 p. 100 - 0,4 p. 100 - 1 p. 100.

t_e : temps de coagulation.

t_i : durée d'irradiation.

2. Action des ultrasons sur la chymosine en solution dans différents milieux

Les résultats sont reportés sur la figure 4. La chymosine se trouve à la concentration de 0,4 p. 100 dans tous les cas. Le rôle des tampons apparaît nettement. Le tampon phosphate 0,05 M, pH 6 protège

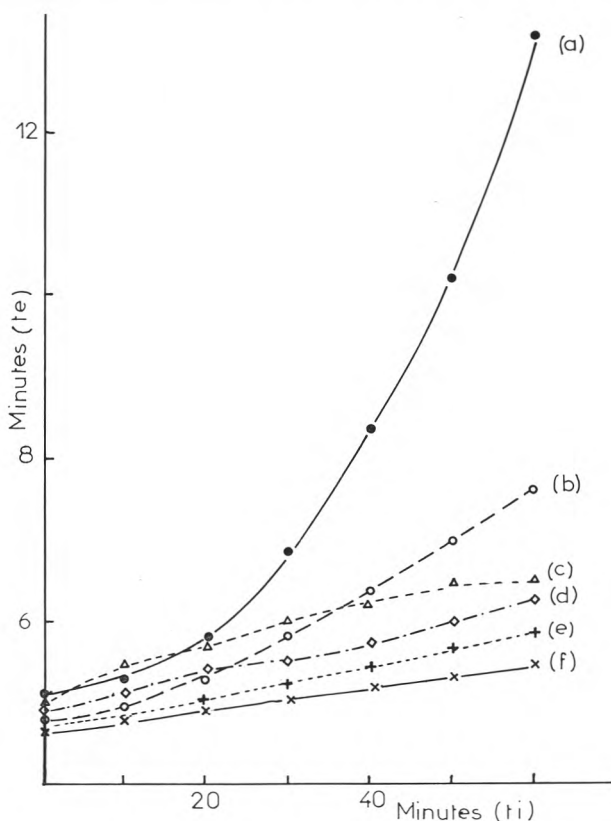


fig. 4

Activité coagulante des solutions de chymosine à 0,4 p.100, dans l'eau (a), le tampon phosphate (b), le tampon citrate (c), le tampon pyridine (d), la solution de sérum albumine à 0,5 p.100 (e) et la solution de séroprotéines lactiques (f). t_e : temps de coagulation, t_i : durée d'irradiation.

l'enzyme de la cavitation ultrasonore, mais moins que le tampon citrate 0,05 M, pH 6, et encore moins que le tampon pyridine 0,05 M, pH 6 (courbes b, c, d). Prudhomme et Grabar ont montré que le phénomène de cavitation diminue d'intensité avec l'augmentation de la concentration en électrolyte, par suite de la diminution de la solubilité des gaz dans le milieu. Mais ici, il doit s'agir d'un autre phénomène car la concentration du tampon est très faible et, de plus, la solution de l'enzyme utilisée contient déjà 0,06 M de NaCl.

Si l'on opère en présence de sérum albumine à 0,5 p.100 (courbe e), ou en présence de séro-protéines à 0,5 p.100 (courbe f), la protection de la chymosine est presque complète. Les temps de coagulation restent pratiquement inchangés, même après 1 h d'irradiation ultrasonore. La protection ne doit pas résulter d'une simple diminution de la cavitation car l'addition de 0,5 p.100 de protéine ne modifie que très peu la viscosité de la solution d'enzyme (la viscosité relative, par rapport à l'eau à 20° C, est de 1,1 pour la solution de sérum albumine et de 1,3 pour celle des séro-protéines).

3. Action des ultrasons sur les autres enzymes coagulantes

Les mesures faites, dans les mêmes conditions que précédemment, sur la pepsine et les enzymes fongiques en solution à 0,2 p.100 (Ren 2 p.100), montrent que les enzymes des *Mucor* sont insensibles à l'action des ultrasons cavitants (tab. 2) ; l'enzyme Ep présente un très faible allongement du temps de coagulation ($\times 1,1$) et la pepsine porcine un allongement un peu plus fort ($\times 1,2$).

La concentration en enzyme pure de toutes ces préparations n'est pas exactement connue. Si l'on faisait l'hypothèse d'une activité spécifique comparable, dans le lait utilisé, on concluerait que les enzymes fongiques sont beaucoup plus résistantes que la chymosine à l'action des ultrasons, l'activité relative avant irradiation étant peu différente (chymosine 1 ; Ep 3,5 ; Mm (Ren) 1,9 ; Mm (Fro) 1,2 ; Mp 3,3). Pour la pepsine, il serait plus difficile de conclure, car la préparation a une activité 16,5 fois plus grande que celle de la chymosine.

4. Action des ultrasons sur les enzymes purifiées par dialyse

La dialyse élimine le chlorure de sodium qui est l'agent diluant des enzymes dans la forme utilisée en pratique.

Le tableau 2 montre que les enzymes dialysées en solution à 0,2 p.100 sont peu ou pas sensibles à l'irradiation, à l'exception de la chymosine dont le temps de coagulation se trouve multiplié par 1,2 avec un temps d'irradiation de 1 h.

L'activité spécifique de la chymosine dialysée est 12,5 fois celle de l'enzyme brute ; la solution à 0,2 p.100 d'enzyme dialysée correspond donc à une solution à 2,5 p.100 d'enzyme brute. Avec cette dernière, nous n'avons pas dépassé la concentration de 1 p.100 et, pour cette concentration, nous avons observé un temps de coagulation multiplié par 1,4, pour 1 h d'irradiation. Il est donc possible que la chymosine ait à peu près la même sensibilité à l'irradiation sous la forme purifiée que sous la forme brute contenant NaCl.

Avec les autres enzymes dialysées, une autre série de mesure a été faite à une concentration quatre fois plus faible ; la sensibilité à l'irradiation est accrue, mais faiblement, de 2 à 20 p.100. Il apparaît

TABLEAU 2

Temps de coagulation avec les solutions d'enzymes soumises à l'irradiation*

Enzyme	Concentration en p. 100	Temps d'irradiation en mn				
		20	40	60	120	240
Chymosine brute	0,2	185	375	600	130	200
Chymosine brute	1,0	108	120	140		
Chymosine dialysée	0,2	106	114	120		
Pepsine brute	0,2	102	105	120	130	200
Pepsine dialysée	0,2	100	100	100		
Pepsine dialysée	0,05	105	110	116		
Ep brute	0,2	107	110	112	130	200
Ep dialysée	0,2	100	100	100		
Ep dialysée	0,05	105	108	110		
Mm (Ren) brute	2,0	100	101	101	130	200
Mm (Ren) dialysée	0,2	105	106	106		
Mm (Ren) dialysée	0,05	102	105	108		
Mm (Fro) brute	0,2	99	98	98	130	200
Mm (Fro) dialysée	0,2	102	102	102		
Mm (Fro) dialysée	0,05	112	113	117		
Mp brute	0,2	102	103	106	130	200
Mp dialysée	0,2	104	106	106		
Mp dialysée	0,05	110	115	123		

* Valeur 100 avant irradiation.

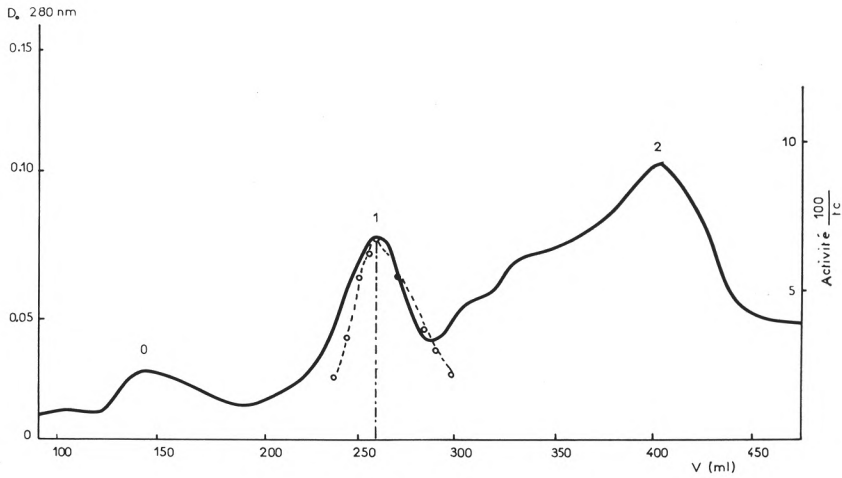


fig. 5

Diagramme d'élution de la chymosine, sur colonne de Séphadex G 100 ($100 \times 2,5$ cm), par le tampon phosphate de Na 0,1 M, pH 7,0, en pointillé, le temps de coagulation.

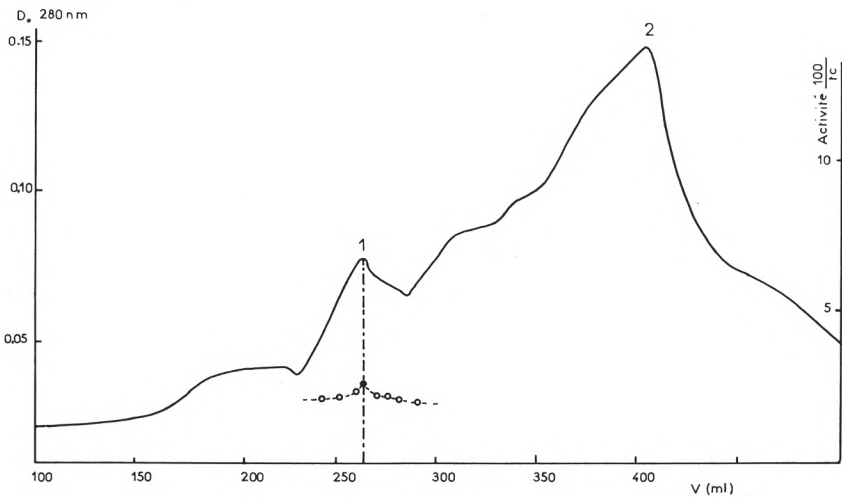


fig. 6

Diagramme d'élution de la chymosine traitée aux ultrasons, (conditions identiques à celles de la figure 5).

nettement que les enzymes coagulantes fongiques sont très résistantes aux ultrasons.

5. Chromatographie d'exclusion sur Séphadex G-100

Afin d'étudier les modifications moléculaires que peut subir la chymosine après traitement aux ultrasons, nous avons passé sur la même colonne, et dans des conditions rigoureusement identiques, une solution de chymosine dialysée à 0,2 p. 100 et la même solution après une irradiation très longue, 4 h, qui a diminué deux fois l'activité coagulante (tab. 2). Les figures 5 et 6 montrent les diagrammes d'élution.

Avant irradiation, on observe trois pics principaux : un petit pic sans activité coagulante (0), qui représente environ 5 p. 100 de l'ensemble ; un pic symétrique (1), où se retrouve l'activité coagulante et représente environ 25 p. 100 ; le troisième pic (2), est très irrégulier, il rassemble les substances de faible poids moléculaire, sans activité coagulante, et représente environ 70 p. 100.

Après irradiation, le pic (0) semble avoir disparu, le pic (1) a son sommet exactement à la même position qu'avant irradiation (261 ml) et pour la même valeur de densité optique, mais sa partie droite est déformée et mal séparée du grand pic irrégulier (2), qui se trouve toujours à peu près à la même place que précédemment. Une faible activité coagulante est repérée au niveau du sommet du pic (1). Il est difficile d'évaluer les deux pics du fait de leur séparation imparfaite, mais il est évident que le pic (2) de la figure 6 est relativement plus important que celui de la figure 5.

Ces expériences montrent qu'après irradiation ultrasonore, la molécule enzymatique doit conserver la même masse ; mais il se peut qu'elle subisse une modification de conformation réduisant son activité. L'accroissement du pic (2) peut signifier aussi une accumulation de peptides résultant de la décomposition partielle de l'enzyme.

Par cette méthode de filtration sur gel, en utilisant les marqueurs indiqués précédemment, nous avons calculé un poids moléculaire de 31 000, correspondant au volume d'élution de 261 ml. Par la même méthode Djurtoft *et al.* avait obtenu la valeur de 33 000 [14] pour la chymosine cristallisée.

6. Formation et influence de l'eau oxygénée

Le tableau 3 montre que l'irradiation ultrasonore provoque une très faible apparition de H_2O_2 dans les solvants et dans les solutions de chymosine à 0,4 p. 100, le cas de la pyridine faisant exception : en présence de pyridine, on ne trouve pas de trace de H_2O_2 . Pour les autres solvants, on n'observe que des différences minimales. La quantité de H_2O_2 produite en présence de l'enzyme est tantôt supérieure, tantôt inférieure à celle produite dans le solvant seul. Il n'y a, en tout cas,

TABLEAU 3. — Dosage de l'eau oxygénée ($\mu\text{g/ml}$)

Temps d'irradiation (mn)	S ₁	S ₁ + Ch	T ₁	T ₁ + Ch	T ₂	T ₂ + Ch	S ₂ + Ch	S ₃	S ₃ + Ch
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0,27	0,40	0,32	0,35	0	0	0,67	0,54	0,86
20	0,62	0,67	0,32	0,43	0,27	0,40	0,81	0,73	1,02
30	0,81	0,81	0,62	0,73	0,40	0,54	1,11	1,35	1,21
40	1,35	1,21	0,67	0,82	0,54	0,83	1,30	1,43	1,48
50	1,57	1,48	0,94	0,96	0,67	1,13	1,54	2,16	1,89
60	2,08	1,89	1,21	1,57	0,81	1,51	1,84	2,32	2,03

S₁ eau distillée.

Ch chymosine diluée à 0,4 p. 100 dans les différents tampons et solutions.

T₁ Tampon phosphate 0,05 M, pH 6.

T₂ tampon citrate 0,05 M, pH 6.

S₂ solution de sérum albumine à 0,5 p. 100.

S₃ solution de séro-protéines à 0,5 p. 100.

pas de rapport entre cette valeur et l'activité coagulante après irradiation, telle qu'elle est montrée dans la figure 4.

Pour les six solutions de chymosine on note les valeurs suivantes, après 1 h d'irradiation ultrasonore (la concentration de 2 µg/ml correspond à une dilution au 170 000^e du perhydrol à 34 p. 100) :

	Quantité de H ₂ O ₂ en µg/ml —	Allongement du temps de coagulation —
Dans l'eau :	1,89	× 2,6
Dans le tampon phosphate :	1,57	× 1,6
Dans le tampon citrate :	1,51	× 1,3
Dans le tampon pyridine :	0,00	× 1,3
Dans le sérum albumine (0,5 p. 100) :	1,84	× 1,2
Dans les séroprotéines (0,5 p. 100) :	2,03	× 1,2

Si l'eau oxygénée intervenait dans la dénaturation de la chymosine, ce ne pourrait être que pour une très faible part.

Remerciements

Nous remercions MM. P. Wolstroff et J. F. Pautex pour leur efficace collaboration technique.

Résumé

Les différentes enzymes coagulant le lait (chymosine ou présure, pepsine, protéases de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica*) ne présentent pas la même sensibilité à l'action dénaturante des ultrasons cavitant ; les enzymes fongiques sont les plus résistantes. La baisse de l'activité coagulante de la chymosine croît avec la durée de l'irradiation ultrasonore et avec la dilution de la solution. En milieu tamponné, à pH 6,0, ou en présence de protéines à 0,5 p. 100, on observe un effet protecteur. L'eau oxygénée apparaît en très faible quantité après irradiation ; elle ne paraît pas jouer de rôle dans l'effet destructeur. La chromatographie d'exclusion montre la persistance, après irradiation, d'un pic correspondant au poids moléculaire de la chymosine et une augmentation du pic rassemblant les peptides inactifs.

Summary

EFFECTS OF ULTRASONIC CAVITATION ON CLOTTING ENZYMES

The different enzymes used for clotting the milk, (chymosin or rennin, pepsin, proteases from *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endo-*

thia parasitica), do not present the same sensitivity to the denaturation by ultrasonic cavitation. The fungal enzymes are the most resistant. Decrease of the clotting activity of chymosin increases with irradiation time and with the dilution of the solution. In buffered media, at pH 6,0, or in the presence of 0,5 p. 100 proteins, we observe a protecting effect. Hydrogen peroxyde is formed in very small quantities and it does not seem to play any role in the denaturing effect. Exclusion chromatography shows the persistance, after irradiation, of a peak corresponding to the molecular weight of chymosin, with an increase of the peak gathering the inactif peptides.

Reçu pour publication en août 1977.

Bibliographie

- [1] EL'PINER (I. E.) (1964). — Ultrasound Physical, Chemical and Biological Effects. Consultants Bureau, N.Y.
- [2] KELLY (E.) (1965). — Ultrasound Energy : Biological Investigations and medical applications. Univ. of Illinois, Urbana.
- [3] Mac LEOD (R. M.) and DUNN (F.) (1967). — Effects of Ultrasonic Cavitation on Trypsin Chymotrypsin and Lactate deshydrogenase solutions. *J. Accoustical Soc. America*, 42, 527.
- [4] DUNN (F.) and Mac LEOD (R. M.) (1968). — Effects of Intense Noncavitating Ultrasound on selected enzymes. *J. Accoustical Soc. America*, 44, 932.
- [5] PEACOCKE (A. R.) and PRITCHARD (N. J.) (1968). — Some Biophysical Aspect of Ultrasound. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 18, 185.
- [6] ALAIS (C.) (1974). — Biochimie de la coagulation enzymatique du lait. *Chimia*, 28, 597.
- [7] TARODO DE LA FUENTE (B.) and ALAIS (C.) (1975). — Physico-chemical studies on the enzymatic coagulation of milk. *Chimia*, 29, 379.
- [8] LOISELEUR (J.) (1944). — Sur l'activation de l'oxygène par les ultrasons. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 218, 876.
- [9] CHAPON (S.), CHAPON (L.) et URION (E.) (1962). — L'oxydation de l'acide ascorbique en présence de bleu de méthylène. Nouveaux développements de l'étude des peroxydes. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 329, 2012.
- [10] BERRIDGE (N. J.) (1945). — The purification and crystalization of rennin. *Biochem. J.*, 39, 179.
- [11] BECK (J.) et ROUYER (M.) (1951). — Etude de la coagulation du lait par la présure. I. Action des ultrasons. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 69.
- [12] DOGNON (A.) et SIMONOT (Y.) (1951). — Cavitation et hémolyse par ultrasons de fréquences différentes. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 232, 2411.
- [13] BIANCANI (E.), BIANCANI (N.) et DOGNON (A.) (1932). — Action des ondes ultrasonores sur les cellules isolées en suspension. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 194, 2168.
- [14] DJURTOFT (R.), FOLTMANN (B.) and JOHANSEN (A.) (1964). — Studies on rennin VIII : on the molecular weight of prorennin and rennin. *C.R. Lab. Carlsberg*, 34, 287.