

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Influencia de los iones Mg^{++} y Mn^{++} sobre la absorción de glucosa por la levadura

por
R. Parés-Farrás*

(Recibido para publicar el 17 de diciembre de 1956)

ROTHSTEIN y MEIER (13) encontraron que apropiadas concentraciones de Mg^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} y Zn^{++} son capaces de desplazar al ion uranilo de la membrana celular, suprimiendo el efecto inhibitor de este último sobre la absorción de glucosa por la levadura. Con el uso de isótopos radiactivos, ROTHSTEIN (10) llega a la conclusión que, en ausencia de fosfato exterior, los efectos metabólicos de los metales divalentes deben corresponder a reacciones desarrolladas exclusivamente sobre la superficie celular. SCHMIDT, HECHT y THANHAUSER (14) ya habían establecido previamente que durante la absorción de fosfato puede penetrar dentro de la célula una elevada proporción de iones divalentes bajo la forma de un complejo de fosfato. En presencia de un exceso de fosfato exterior, todos los iones divalentes del medio son introducidos en la célula (9).

ROTHSTEIN (9, 10) encontró también que la adición de Mg^{++} , Ca^{++} o Mn^{++} a una suspensión en glucosa de células de levadura bien lavadas, producía una estimulación de la fermentación alcohólica variable según el pH del medio. El efecto máximo se conseguía a pH 6, donde la velocidad normal de fermentación se halla considerablemente reducida (9). Se probó igualmente que los iones divalentes fijados por la célula eran fácilmente intercambiables, en tanto que los iones endocelulares no lo son (9, 10).

* Becario del Patronato Juan de la Cierva.

En un tratamiento corto, la desionización con resinas de intercambio iónico reduce la absorción de glucosa en un 30 ó 40 %. Con doce horas, la capacidad de fermentación se destruye total e irreversiblemente (9). En estas experiencias, ROTHSTEIN encontró que una parte de la inhibición parcial de la capacidad de fermentación podía ser restituida adicionando cationes divalentes al medio. El resto se relacionó de un lado con la pérdida de K^+ y de otro con la pérdida de iones intracelulares (9). Esta última representa una fracción de la capacidad de fermentar la glucosa que no puede restituirse añadiendo iones al medio.

Las experiencias con resinas de intercambio iónico resultan de difícil interpretación. En conjunto, el tratamiento con resinas es demasiado enérgico, ya que al mismo tiempo que lleva fuera de la superficie celular a los iones divalentes, extrae a los iones monovalentes e incluso induce otras perturbaciones irreversibles. En principio, sólo puede concluirse que la absorción de glucosa se halla influida de algún modo por la presencia de cationes divalentes a nivel de la superficie celular.

En el presente trabajo, se estudia la influencia de los iones Mg^{++} y Mn^{++} sobre la velocidad de utilización de glucosa exterior por la levadura. Por un camino completamente distinto al utilizado por ROTHSTEIN se determina su lugar de acción y, finalmente, se aprovecha la capacidad de formar quelatos del ácido etilen-diamino-tetracético y de algunas de sus sales alcalinas para sustraer los iones superficiales selectivamente y de un modo mucho menos violento que con resinas de intercambio.

Material y métodos

Se utiliza levadura fresca de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). La concentración celular se determina por medidas de sedimento constante según el procedimiento indicado en trabajos anteriores (2, 3, 4, 5).

Las medidas de utilización de glucosa exterior se llevaron a cabo bajo condiciones anaeróbicas siguiendo un método inspirado en el utilizado por ROTHSTEIN y LARRABEE (12) y que ya ha sido detallado en otro lugar (3). El período de vaciado de reservas se llevó a cabo en agua destilada y con aireación durante tres o cuatro horas.

La producción de CO_2 se mide con la técnica *standard* de WARBURG. Se consiguen condiciones anaeróbicas reemplazado el aire con nitrógeno previamente purificado (3).

Se utilizó ácido etilen-diamino-tetracético de una pureza

del 99 % (*Nullapon BF-acid*) de *Antara Chemicals*. Con hidróxido sódico pueden conseguirse soluciones en las que predomine una determinada sal sódica del ácido etilen-diamino-tetracético de las cuatro posibles (Cuadro I).

Según los datos suministrados por la firma productora, en el Cuadro I se consigna el orden de preferencia de formación de quelatos de las sales disódica y tetrasódica del ácido etilen-diamino-tetracético. Para nuestro objeto, es particularmente interesante el hecho de que la sal disódica no pueda llevar a cabo una desionización eficiente del Ca^{++} y Mg^{++} .

Resultados

a) ACTIVACION DEL CONSUMO DE GLUCOSA EXTERIOR

En los Cuadros II y III se representan los resultados obtenidos en la investigación de la influencia de los iones Mg^{++} y Mn^{++} sobre la utilización de glucosa exterior por células intactas de levadura (6). Las experiencias se llevaron a cabo a pH 3,5, donde la propia levadura actúa de sistema amortiguador (3).

CUADRO I

Orden de preferencia de la formación de quelatos de las sales disódica y tetrasódica del ácido etilen-diamino-tetracético

pH	Sal predominante	Orden sucesivo de preferencia para la formación de quelatos
5 — 7,5	disódica	Ni^{++} , Cu^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} ,
9,5 — 12	tetrasódica	Co^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} .

El Mg^{++} muestra un definido efecto estimulante de la absorción de glucosa desde una concentración tan baja como 0,005 M. A una concentración de azúcar de 0,6 %, la activación crece rápidamente hasta una concentración de Mg^{++} de 0,02 M, luego sigue aumentando más lentamente y de una forma lineal. Cuando la concentración de azúcar es 1,2 %, la curva de activación sigue desde el origen un curso paralelo a la porción lineal de la curva correspondiente al 0,6 % de glucosa (fig. 1). La activación parece estar influida por la concentración de glucosa, aumentando al disminuir ésta. Dentro de los límites estudiados, no aparece ningún valor de saturación para el efecto del Mg^{++} .

En el Cuadro III puede observarse el efecto estimulante de la absorción de glucosa por la levadura, obtenido adicionando al medio Mn^{++} hasta una concentración 0,1 M. La activación resulta ser considerablemente menor que la obtenida en las mismas condiciones con una cantidad equivalente de Mg^{++} . Sin

CUADRO II

Efecto del Mg^{++} sobre la absorción de glucosa por la levadura
Levadura en peso seco: 14,25 mg./ml. (0,03 ml./ml.); pH 3,5; 30° C.

Mg^{++} (mols/l.) (Cl_2 Mg. 6 H_2O)	Glucosa %	Absorción (mg./30 min.)	Activación %
0,133	1,2 (72 mg.)	54,0	23,70
0,067		48,6	11,34
0,013		45,0	3,09
0,000		43,6	—
0,100	0,6 (48 mg.)	27,2	38,70
0,040		24,8	26,53
0,005		22,4	14,28
0,000		19,6	—

CUADRO III

Efecto del Mn^{++} sobre la utilización de glucosa exterior
Levadura en peso seco: 14,25 mg./ml. (0,03 ml./ml.); pH 3,5; 30° C.
Glucosa 0,6 % (48 mg./tubo)

Mn^{++} (mols/l.) (Cl_2 Mn. 4 H_2O)	Absorción (mg./30 min.)	Activación %
0,1	40,3	15,1
0,1	40,3	15,1
0	35	—
0	35	—

embargo, las absorciones absolutas en uno y otro caso resultaron demasiado distintas para poder considerar esta conclusión como totalmente definitiva.

b) LUGAR DE ACCIÓN DE LOS CATIONES DIVALENTES

Por incubación previa de las células de levadura en solución de glucosa puede conseguirse inducir una fermentación alcohólica endógena bien medible (1, 3, 7, 8). La naturaleza endógena y glucídica del anhídrido carbónico producido en es-

tas condiciones se ha puesto singularmente de manifiesto por la acción del uranilo y del fluoruro, así como también por la influencia del tiempo de incubación con glucosa en exceso (3, 7, 8).

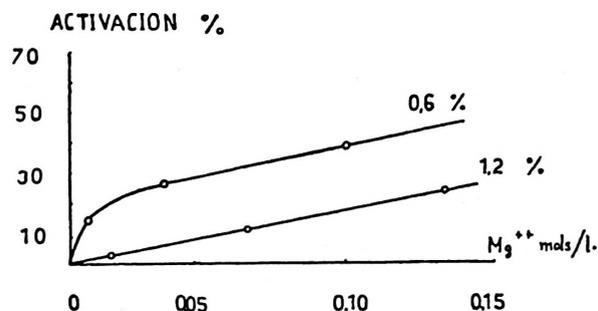


Figura 1

Efecto del ion Mg⁺⁺ sobre la absorción de glucosa por la levadura (peso seco de levadura: 14,25 mg/ml., pH 3,5, 30° C)

Al disminuir la glucosa exterior, el efecto del Mg⁺⁺ crece y para una concentración inicial de 0,6 % de glucosa, la activación correspondiente a una concentración 0,005 M de Mg⁺⁺ alcanza ya un 14 %. Sin embargo, en el Cuadro IV se pone de manifiesto qué concentraciones de hasta 0,1 M. de Mg⁺⁺ son incapaces de modificar la fermentación alcohólica inducida

CUADRO IV

Efecto del Mg⁺⁺ sobre la fermentación alcohólica endógena
Levadura en peso seco: 14,25 mg./ml. (0,03 ml./ml.); pH 3,5; 30° C.

Mg ⁺⁺ (mols/l.) (Cl ₂ Mg. 6 H ₂ O)	l. de CO ₂ desprendidos en 1/2 h.		Activación %
	Con Mg ⁺⁺	Sin Mg ⁺⁺	
0,100	50	51	—
	44	46	—
	34	33	—
	Media 43	43	0

por previa incubación de la levadura en glucosa (6). Por lo tanto, haya penetrado o no, el efecto del Mg⁺⁺ no puede haber tenido lugar sobre el consumo de glucosa y deberá referirse exclusivamente a un aumento de la penetración de azúcar a través de la membrana celular.

c) DESIONIZACIÓN CON SALES ALCALINAS DEL ÁCIDO ETILEN-DIAMINO-TETRACÉTICO

Se han llevado a cabo varias experiencias para desionizar de iones divalentes la membrana celular de la levadura. Una pequeña porción de levadura ha sido lavada dos veces con una solución al 1 por mil de la sal disódica (pH 6). Otra operación análoga se ha llevado a cabo con la sal tetrasódica (pH 10). La relación ponderal entre levadura y solución del agente secues-

CUADRO V

Absorción de glucosa por la levadura después de lavado previo con la sal disódica (EDD) y tetrasódica (EDT) del ácido etilen-diamino tetracético

Levadura en peso seco: 14,25 mg./ml. (0,003 ml./ml.); pH 3,5; 30° C.; glucosa 0,4 % (32 mg./tubo)

Mg ⁺⁺ (mols/l.) (Cl ₂ Mg. 6 H ₂ O)	EDD 1 ‰ pH 5-6	EDT 1 ‰ pH 10-11	Absorción		% Inhibición
			mg./30 min.	%	
0,1 M	—	+	30	94	0
0,1 M	—	+	30	94	0
—	—	+	26,9	84	11
—	—	+	26,9	84	11
—	+	—	29,4	92	2
—	+	—	29,4	92	2
—	—	—	30,25	94	—
—	—	—	30,25	94	—

trador de iones ha sido en ambos casos de 3,3 : 120. Seguidamente, las dos muestras fueron sometidas a tres lavados consecutivos con agua destilada. Con un control lavado con agua pero no sujeto a ningún otro tratamiento, se midió la absorción de glucosa bajo las condiciones expresadas en el Cuadro V. Se encontró que la sal disódica del agente secuestrador de iones apenas modificaba la absorción, en tanto que la sal tetrasódica la reducía en un 11 %.

En presencia de Mg⁺⁺ 0,1 M. desaparece completamente la inhibición (Cuadro V). El efecto del lavado con la sal tetrasódica del ácido etilen-diamino-tetracético debe, pues, atribuirse exclusivamente a una desionización de cationes divalentes, superficial y completamente reversible. La ineficacia de la sal disódica deberá entonces traducirse en el sentido de que el Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ son los únicos iones que pueden intervenir normalmente en la transferencia de glucosa a través de la membrana celular.

En el Cuadro VI se pone de manifiesto que aumentando el volumen de elución hasta la proporción de 1 : 100 en el lavado previo con el agente secuestrador de iones, no se consigue aumentar la inhibición del paso de glucosa a través de la membrana. Prácticamente se logran iguales efectos con relaciones ponderales entre levadura y eluente de 1 : 20, 1 : 50 y 1 : 100. Por tanto, cabe esperar que se haya conseguido la desionización máxima posible con el etilen-diamino-tetracetato sódico.

CUADRO VI

Absorción de glucosa por la levadura después de lavado previo con etilen-diamino-tetracetato sódico

Levadura en peso seco: 14,25 mg./ml. (0,003 ml./ml.); pH 3,5; 30° C.; glucosa 0,4 % (32 mg./tubo); EDT 1 ‰

Relación eluente/levadura	Absorción		Inhibición %
	mg./30 min.	%	
100	16	67	8
100			
50	16	67	8
50			
20	15,6	65	11
20			
Control	17,6	73	—
Control			

La inhibición producida por lavado previo con etilen-diamino-tetracetato sódico se hace totalmente reversible añadiendo Mg^{++} al medio exterior. La desionización se habrá verificado exclusivamente sobre la superficie, pero existe la posibilidad de que la importancia reserva endocelular pueda substituir por otros nuevos a los iones sustraídos de la membrana. Sin embargo, un tratamiento prolongado de las células con un gran exceso de etilen-diamino tetracetato sódico no consigue reducir la capacidad de absorción de glucosa en mayor grado que con los anteriores tratamientos (Cuadro VII). Por otra parte, esta inhibición continúa siendo completamente reversible, lo que induce a pensar que los iones endocelulares son difícilmente intercambiables, aun en el caso de haber empobrecido notablemente el contenido superficial de los mismos. Si se hubieran desplazado muchos iones endocelulares, la inhibición sería mayor o por lo menos, no totalmente reversible. Al parecer, la célula de levadura puede continuar absorbiendo glucosa casi normalmente después de una intensa reducción del

contenido de cationes divalentes de la membrana. Esta conclusión deberá ser válida, por lo menos, para los niveles de glucosa exterior a los que se han realizado las experiencias, existiendo la posibilidad de que deje de cumplirse para concentraciones más pequeñas.

CUADRO VII

Absorción de glucosa por la levadura después de un tratamiento prolongado (3 horas) con etilen-diamino-tetracetato sódico
 Levadura en peso seco: 14,25 mg./ml. (0,003 ml./ml.); pH 3,5; 30° C.;
 glucosa 0,3 % (24 mg./tubo)
 Desionización: Levadura 2 %, EDT 0,5 %. Dos lavados consecutivos con agua destilada

Mg ⁺⁺ (mols/l.) (Cl ₂ Mg. 6 H ₂ O)	Mn ⁺⁺ (mols/l.) (Cl ₂ Mn. 4 H ₂ O)	Absorción		Inhibición %
		mg./30 min.	%	
—	0,05 M	21,4	89	— 6
—	0,05 M	—	—	—
—	—	18	75	11
—	—	—	—	—
0,05 M	—	19,5	81	3
0,05 M	—	—	—	—
—	—	20	84	—
—	—	—	—	—

Según puede observarse en el Cuadro VII, la inhibición producida por incubación previa de las células en etilen-diamino-tetracetato sódico es igualmente reversible añadiendo al medio Mg⁺⁺ que Mn⁺⁺. Este último ión parece incluso ligeramente más efectivo.

Comparando los resultados de los Cuadros II y III con los de los Cuadros V, VI y VII, resulta particularmente interesante destacar que la utilización aneróbica de glucosa exterior por la levadura, puede activarse mucho más añadiendo al medio Mg⁺⁺ o Mn⁺⁺ que inhibirse por desionización de la membrana celular con etilen-diamino-tetracetato sódico.

Conclusión

En presencia de Mg⁺⁺ o Mn⁺⁺, las células de levadura son capaces de tomar glucosa del medio con una velocidad mayor que sin adicionar iones divalentes. Comparando nuestros resultados con los de ROTHSTEIN (9), parece confirmarse el supuesto señalado de que la acción del Mg⁺⁺ se halla muy in-

fluída por la concentración inicial de glucosa, aumentando rápidamente cuando ésta disminuye. En cambio, el efecto del Mn^{++} parece ser independiente de la concentración de azúcar y sólo influenciado por el pH.

A las numerosas y convincentes pruebas aportadas por ROTHSTEIN y sus colaboradores sobre la acción puramente superficial de los cationes divalentes (9, 10, 11, 12, 13), cabe ahora añadir nuestras experiencias sobre su ineficacia para afectar a la fermentación alcohólica endógena. Por otra parte, si se admite como hecho establecido que en ausencia de fosfato exterior los metales divalentes añadidos al medio sólo pueden afectar al paso de glucosa a través de la membrana, nuestros resultados pueden tomarse en el sentido de una nueva confirmación de la naturaleza endógena de la fermentación inducida en la levadura por previa incubación en glucosa (1, 3, 7, 8).

ROTHSTEIN pudo suministrar varios datos experimentales que parecen poner de manifiesto que los puntos de unión del uranilo en la membrana celular son los mismos que los de los cationes divalentes (9). Como se sabe (9, 13), estos puntos de la superficie celular se han identificado con polimetafosfatos del tipo del ATP y ha resultado extraordinariamente sugestivo que en ellos pueda residir el sistema donador de energía asociado al mecanismo de transferencia activa de glucosa. Esta hipótesis resulta compatible incluso admitiendo que el verdadero mecanismo de transferencia nos es todavía fundamentalmente desconocido. Parece claro que cuando estos polimetafosfatos se hallan unidos al uranilo el transporte de glucosa no puede proseguir, en tanto que unidos a cationes divalentes tiene lugar con toda normalidad. Las experiencias de competencia ponen de manifiesto que el complejo con el uranilo es mucho más estable que el correspondiente a los iones Mg^{++} o Mn^{++} (11, 13). Cabe ahora preguntarse qué iones divalentes intervienen en el transporte fisiológico de glucosa en la levadura y hasta qué punto son imprescindibles para el mismo.

La fermentación alcohólica puede ser activada por los iones Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} y Zn^{++} . Sin embargo, sólo los tres primeros pueden intervenir normalmente en la penetración de azúcar. En efecto, el tratamiento con etilen-diaminodiacetato sódico ha resultado prácticamente inefectivo (Cuadro II), mientras que con la sal tetrasódica se consigue reducir la capacidad de las células de levadura para tomar glucosa del medio exterior. Teniendo en cuenta el orden de preferencia de formación de quelatos de este compuesto (Cuadro I), se sigue que en ambos casos el Ba^{++} y el Zn^{++} serían igualmente substraídos de la membrana, en tanto que sólo con la sal neu-

tra podrá conseguirse la separación del Mg^{++} , Mn^{++} y Ca^{++} .

De las experiencias de desionización se deduce que la penetración de glucosa debe poder proseguir de un modo considerablemente eficiente cuando una elevada proporción de los puntos superficiales interesados con el uranilo y los iones divalentes, se hallen unidos a metales alcalinos. El comportamiento observado sugiere que incluso no existe ninguna tendencia definida al intercambio con metales divalentes del contenido endocelular. En conjunto, parece poco plausible que los metales divalentes puedan desempeñar una función esencial en el transporte de glucosa a través de la membrana celular y por el momento, sólo cabe considerarlos como simples cofactores inespecíficos.

Resumen

Se estudia el efecto activador del Mg^{++} y Mn^{++} sobre la absorción de glucosa por suspensiones de células intactas de levadura (*Saccaromyces cerevisiae*). Su ineficacia sobre la fermentación alcohólica endógena permite asignarles una acción puramente superficial.

Por medio de sales alcalinas del ácido etilen-diamino tetracético se llevan a cabo varias experiencias de desionización selectiva de la membrana celular. Se encuentra que la sustracción de cationes divalentes reduce la velocidad de absorción de glucosa. Fundándose en el orden de preferencia de la formación de quelatos de las distintas sales del ácido etilen-diamino tetracético, se determina que sólo puede ser efectiva la sustracción de Mg^{++} , Mn^{++} o Ca^{++} . La inhibición conseguida se hace siempre totalmente reversible por adición de Mg^{++} o Mn^{++} . Aumentando progresivamente los volúmenes de elución, se consigue una inhibición constante y por prolongada incubación en un exceso de agente secuestrador de iones, se logra el mismo grado de inhibición e igualmente reversible.

Se concluye que para los niveles de glucosa comprendidos en las experiencias, la célula de levadura puede continuar absorbiendo glucosa casi normalmente, después de una intensa reducción del contenido de cationes divalentes de la membrana. El comportamiento observado sugiere también que no existe ninguna tendencia apreciable a intercambiar los metales alcalinos con cationes divalentes del contenido endocelular. En conjunto, parece poco plausible que los metales divalentes puedan desempeñar una función esencial en el transporte de glucosa a través de la membrana celular y por el momento, sólo cabe considerarlos como simples cofactores inespecíficos.

Summary

The effect of Mg^{++} and Mn^{++} ions on the glucose uptake in yeast

As has been said in detail in a previous work (3), utilisation of exterior glucose by baker's yeast under anaerobic conditions is determined, and the production of carbon dioxide is measured by the Warburg apparatus.

In the tables II, III and in figure I, it is shown that the Mg^{++} and Mn^{++} ions are capable of increasing the amount of glucose taken from the medium by a suspension of intact baker's yeast cells.

The effect of Mg^{++} seems to be influenced by the sugar concentration, being greater when this is diminished. On the other hand, the action of Mn^{++} is shown to be independent of the substrate concentration. These results agree even quantitatively with those published by Rothstein and his fellow-workers (9, 10, 11, 13), on the influence of the above-mentioned ions on alcoholic fermentation. Now it is possible to add to the previously contributed tests on the purely superficial action of the divalent cations (9, 10, 11, 13), the experiments shown in table IV, where it is shown that they have no action on endogenous alcoholic fermentation. If it is admitted as an established fact that in the absence of exterior phosphate the divalent metals added to the medium can only affect the passage of glucose through the membrane, our results can be taken as a new confirmation of the endogenous nature of the fermentation induced in yeast by previous incubation in glucose.

The disionization of yeast with the tetrassodium salt of tetracetic ethylene-diamine acid (EDTA) reduces by 10 % the capacity of glucose absorption and the disodium salt does not produce any effect (table V). This inhibition is made completely reversible when Mg^{++} or Mn^{++} is added to the medium (tables V and VII). Taking into account the order of preference of the formation of kelates (table I), it is inferred that the effect found can only be attributed to the superficial subtraction of Mg^{++} of Ca^{++} or of Mn^{++} .

The results indicated in table VI indicate that 10 % inhibition is the maximum effect reached with EDTA, as the inhibition cannot be increased by increasing the volume of the substance. The possibility that the ions taken from the membrane are replaced by others coming from the interior of the cell is turned down because prolonged treatment of the cells with a great excess of EDTA does not succeed in reducing the capacity of glucose absorption more than 10 %. On the other hand, the inhibition continues completely reversible (table VII). Seemingly, for the glucose levels included in our experiments the yeast cell can continue to absorb glucose almost normally, after an intense reduction of the content of divalent cations of the membrane. The behaviour observed suggests that in addition, there may be no definite tendency towards interchange with divalent metals of intracellular content. On the whole, it seems little plausible that the divalent

metals can fulfil an essential function in glucose transport across the cell-membrane, and for the present they can only be considered as simple unspecific cofactors.

Bibliografía

- (1) PARÉS, R. : Inhibidores de membrana en la levadura. Com. 2.^a. Reunión Nac. de Ciencias Fisiológicas, Barcelona, 1955.
- (2) PARÉS, R. : Inhibición del transporte de glucosa en la levadura. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1956.
- (3) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 73, 1956.
- (4) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 129, 1956.
- (5) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 153, 1956.
- (6) PARÉS, R., y LLUCH, M. : Influencia de algunos cationes divalentes sobre la absorción y consumo de glucosa por la levadura. Com. 3.^a. Reunión Nac. de Cienc. Fisiol., Madrid, 1956.
- (7) PONZ, F., y PARÉS, R. : Membrane inhibitors of glucose transfer in yeast. 3.^{ème} Congr. Internat. de Biochim. Bruxelles, 1955.
- (8) PONZ, F., y PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **11**, 253, 1955.
- (9) ROTHSTEIN, A. : The enzymology of the cell surface. Protoplasmatología. Springer-Verlag, Wien, 1954.
- (10) ROTHSTEIN, A. : International Conference on the Peaceful Uses of atomic Energy. A/Conf. 8/P/267, 1955.
- (11) ROTHSTEIN, A., y HAYES, A. D. : *Archiv. Bioch. Biophys.*, **63**, 87, 1956.
- (12) ROTHSTEIN, A., y LARRABÉE, C. : *Jour. cell. and comp. Physiol.*, **32**, 247, 1948.
- (13) ROTHSTEIN, A., y MEIER, R. : *Jour. cell. and comp. Physiol.*, **38**, 245, 1951.
- (14) SCHMIDT, G., HECHT, L., y THANHAUSER, S. J. : *Jour. biol. Chem.*, **178**, 733, 1949.

COMUNICACIONES
ESPAÑOLAS

AL

XX CONGRESO INTERNACIONAL DE FISIOLOGIA

CELEBRADO EN BRUSELAS
DEL 20 DE JULIO AL 4 DE AGOSTO
DE 1956