

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

Acción de varias insulinas cristalizadas y un glucagón sobre la respiración endógena de la levadura

R. Parés* y J. Planas

(Recibido para publicar el 12 de enero de 1956)

Introducción

El efecto de la insulina sobre el metabolismo de la levadura y de otros microorganismos ha sido estudiado desde poco después del descubrimiento de la hormona. Sin embargo, una revisión de la literatura permite apreciar cierta confusión de resultados.

FÜRTH (6) no encontró acción de la insulina sobre la asimilación de azúcares ni sobre la glucogenolisis en la levadura. TRAVELL y BEHRE (25) tampoco encontraron ningún efecto de la insulina sobre la fermentación de glucosa por levadura. En cambio, ABDERHALDEN (1) consiguió aumentar la velocidad de fermentación de la glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa por acción de la insulina. El mismo autor (2) señaló el importante hecho de la ausencia de correlación entre la actividad hipoglucemiante de distintas insulinas y su efecto sobre la fermentación en la levadura. En consecuencia, atribuyó la activación de la fermentación alcohólica a un factor distinto a la hormona y que la acompañaría en los preparados de la misma.

La acción estimulante de la insulina sobre la fermentación de azúcares también fué confirmada por ZELLER (31). Este

* Con una beca del Patronato Juan de la Cierva.

autor sugirió que el efecto negativo o inverso hallado en algunos casos podía atribuirse a los antisépticos utilizados para la conservación de la insulina en los preparados comerciales.

IMSHENETZKII (12) señaló una acción glucogenolítica de la insulina sobre *S. cerevisiae*.

HERMANN y NEIGER (11) confirmaron la activación de la fermentación alcohólica por células de levadura, en tanto que no encontraron ningún efecto sobre fermentación en extracto libre de células.

WEBER (30) consiguió una estimulación del crecimiento por la insulina cristalizada sobre *Rhodotorula sugari* y *R. glutinis*.

LEHMANN (16) encontró que pequeñas cantidades de insulina inhibían la formación de éster de Embden a partir de glucógeno y fosfato inorgánico en extractos de músculo y de levadura.

ROSENTHAL y KAMLET (19) demostraron que la levadura viva absorbía un 50 a 75 % de la insulina del medio. En sus experimentos, el tiempo y la temperatura parecen influir muy poco sobre la cantidad total de hormona absorbida.

Más recientemente, las experiencias de VALORI (26) (27) parecen poner de manifiesto una inhibición de la glucogenólisis en *Rhodotorula* por efecto de la insulina.

CARERE-COMES y CAPELLO (5) han señalado una ligera inhibición de la respiración de la levadura por efecto de la insulina.

Aparte de su acción sobre los microorganismos ha sido posible establecer la indudable existencia de dos factores antagónicos en los preparados de insulina, incluso en los cristalizados de alta pureza. Uno de estos factores posee acción glucogenogénica y se ha identificado con la misma insulina (3) (7) (8) (9) (10) (14) (15) (18) (20) (21) (28) (29). El otro factor posee acción hiperglucemiante (4) (13) (17) (32) y glucogenolítica (22) (23) (24). Es muy posible que la coexistencia de estos dos factores haya conducido a ciertas contradicciones en los resultados obtenidos sobre microorganismos. En todo caso, desde que ha sido posible aislarlos química y funcionalmente, resulta interesante revisar el efecto correspondiente a cada uno de ellos. Además, por lo que se refiere al glucagón, no existe ningún dato sobre su acción en el metabolismo de la levadura y se desconoce su efecto sobre la respiración (22).

Las precedentes consideraciones nos llevaron a estudiar la acción de la insulina y el factor glucogenolítico acompañante sobre el metabolismo de la levadura. En el presente trabajo se describe el efecto de dichos factores sobre la respiración endógena.

Material y métodos

Se ha utilizado levadura fresca de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). Para separar las materias extrañas contenidas en la levadura comercial, antes de utilizarse se lava dos veces con agua destilada, recogién dose por centrifugación. En el primer sedimento sólo se separa el 80 ó 90 % del material en suspensión. De este modo las células muertas y los fragmentos celulares se eliminan con el líquido sobrenadante.

Para la determinación de la cantidad de levadura se han practicado medidas de sedimento constante a 1.800 r. p. m. Previamente, se ha calibrado el extremo capilar de los tubos de centrifugación en equivalentes de peso seco de levadura.

El consumo de oxígeno se ha determinado con la técnica manométrica de Warburg. Todas las experiencias se han verificado a una temperatura de 30° C ($\pm 0'05^\circ$) y con una agitación de 3 cm. de amplitud y 100 oscilaciones por minuto. La levadura queda en suspensión en agua destilada, adicionando o no solución de insulina o glucagón, con un volumen total de 2 ml. Se ha operado siempre en ausencia de sustrato exterior, en atmósfera de aire y sin amortiguador.

Se han verificado ensayos con las siguientes insulinas cristalizadas (*):

Novo — 3	3 cristalizaciones	23	U. I./mg.
Novo — 10	10 cristalizaciones	23'5	U. I./mg.
Boots	—	23'06	U. I./mg.

Las disoluciones de insulina se han practicado en agua acidulada con ClH (pH 2-3).

Se refieren ensayos en los que se utiliza un glucagón amorfo Lilly (*) de una pureza del 50 % referida a la actividad de un glucagón cristalizado de la misma procedencia.

Resultados

En el cuadro I se halla consignado el efecto de la insulina Novo-3 sobre la respiración endógena de la levadura. Todos los ensayos se llevaron a cabo a un pH de 3-4. El CO₂ fué absorbido por 0'2 ml. de OHK colocados en el depósito central de

(*) Agradecemos a K. Hallas-Möller de «Novo Therapeutisk Laboratorium, a «Boots Pure Drug Co. Ltd» y a W. R. Kirtley de «Eli Lilly and Co», su atención en suministrarnos información y muestras de los correspondientes preparados.

CUADRO I

Acción de la insulina Novo-3 sobre el consumo de O₂ en la levadura a 30° C.

Concentración (1 mg. = 25 U. I.)	μl. absorbidos en 15 minutos por 2 ml de una suspensión de 14,25 mg. de levadura seca por ml.		
	Sin insulina	Con insulina	Inhibición %
36'8 U. I./ml.	135	41	
	137	45'5	
	150	45	
Media	141	44	69
18'4 U. I./ml.	54	—	
	64'5	53'5	
	66'5	46	
Media	62	50	19
3'68 U. I./ml.	97	95	
	102	100	
	123	100	
Media	107	98	4

CUADRO II

Acción inhibitoria de la insulina cristalizada Novo-3 sobre el consumo de O₂ en la levadura a 30° C., con relación al tiempo de experiencia. Concentración Insulina: 18'4 U. I./ml. Concentración levadura: 14'25 mg./ml.

Tiempo	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con insulina	Sin insulina	Inhibición %
15 minutos	—	58	
	53'5	65	
	46	66'5	
Media	50	63	20'5
32 minutos	—	89'5	
	84	103'5	
	83	109	
Media	83'5	101	17
45 minutos	—	117	
	110	130'5	
	106'5	141	
Media	108	130	17

CUADRO III

Acción de la insulina cristalizada Novo-3 sobre el consumo de O₂ en la levadura a 30° C., con relación al tiempo de experiencia. Concentración insulina: 3'68 U. I./ml. Concentración levadura: 14'25 mg./ml.

Tiempo	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con insulina	Sin insulina	Inhibición %
15 minutos	95	96	
	100	101	
	100	122	
Media	98	106	7'5
30 minutos	125	122'5	
	139	133	
	131	171	
Media	132	142	7

CUADRO IV

Acción de la insulina cristalizada Novo-10 sobre el consumo de O₂ endógeno en la levadura a 30° C. Concentración insulina: 36'8 U. I./ml. Concentración levadura: 14'25 mg./ml.

Tiempo	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con insulina	Sin insulina	Inhibición %
15 minutos	104	109	
	111	123	
	119	112'5	
Media	111	118	6
35 minutos	102	110	
	99'5	114	
	108	119	
Media	103	107	4

los frascos de Warburg. En la fig. 1 se representa la correspondiente curva de inhibición.

En los cuadros II y III puede observarse la inhibición del consumo de oxígeno con relación al tiempo de la experiencia, para concentraciones de insulina Novo-3 de 18'4 U. I./ml. y 3'68 U. I./ml., respectivamente. La inhibición parece decrecer ligeramente hasta hacerse constante (figs. 2 y 3).

CUADRO V

Acción de una insulina cristalizada Boots sobre la respiración endógena de la levadura a 30° C.

Concentración (1 mg. = 23,06 U. I.)	μl. de O ₂ absorbidos en 15 minutos por 2,2 ml. de una suspensión de 24,25 mg. de levadura seca por ml.		
	Sin insulina	Con insulina	Inhibición %
36'8 U. I./ml.	52	47	
	56	50	
	56	55	
Media	55	51	7'5
49 U. I./ml.	50	41'5	
	52	45	
	59	45	
Media	54	44	18'5

En el cuadro IV se consigna el efecto de la insulina Novo-10 sobre la respiración endógena de la levadura. Esta insulina fué cristalizada diez veces y solamente tres la insulina de las experiencias anteriores. En la fig. 1 puede observarse que la actividad inhibidora de la muestra Novo-10 es unas cuatro veces menor que la correspondiente a la primeramente ensayada.

En los resultados transcritos en el cuadro V puede observarse que una insulina cristalizada Boots posee también acción inhibidora sobre la respiración endógena de la levadura. A este respecto su efectividad viene a ser del orden de la insulina Novo-10 (fig. 1). Los valores de inhibición se hallan con bastante aproximación sobre dos curvas superponibles por traslación paralela a lo largo de abscisas.

La insulina Novo-3 se inactivó por incubación a 37° C. en

CUADRO VI

Acción de la insulina cristalizada Novo-3, inactivada por incubación en potasa 0'08 N a 37° C., durante 2 1/2 h., sobre el consumo de O₂ endógeno en la levadura a 30° C. Concentración de insulina: 36'8 U. I. / ml. Concentración de levadura: 14'25 mg. / ml.

Tiempo	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con insulina	Sin insulina	Inhibición %
15 minutos	38	106	
	46	118	
	41	127	
Media	42	117	64
30 minutos	72	155	
	77	165	
	72'5	186	
Media	74	169	56

CUADRO VII

Efecto del tratamiento de la insulina cristalizada Novo-3 con KOH 0'08 N a 180° C. durante 40 minutos, sobre su acción en el consumo de O₂ endógeno de la levadura. Concentración de insulina: 36'8 U. I. / ml. Concentración de levadura 14'25 mg. / ml.

Tiempo	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con insulina	Sin insulina	Inhibición %
15 minutos	52	57	
	62'5	57'5	
	61	61	
Media	59	58	0
30 minutos	100	92	
	120'5	94'5	
	124	97'5	
Media	115	95	—

OHK 0'08 N durante 2 horas 30 minutos (22) (24), comprobándose en conejos la completa desaparición del efecto hipoglucemiante.

En el cuadro VI se señala el efecto de la insulina Novo-3

ACCIÓN DE LA INSULINA CRISTALIZADA SOBRE LA RESPIRACIÓN ENDOGENA EN LA LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*)

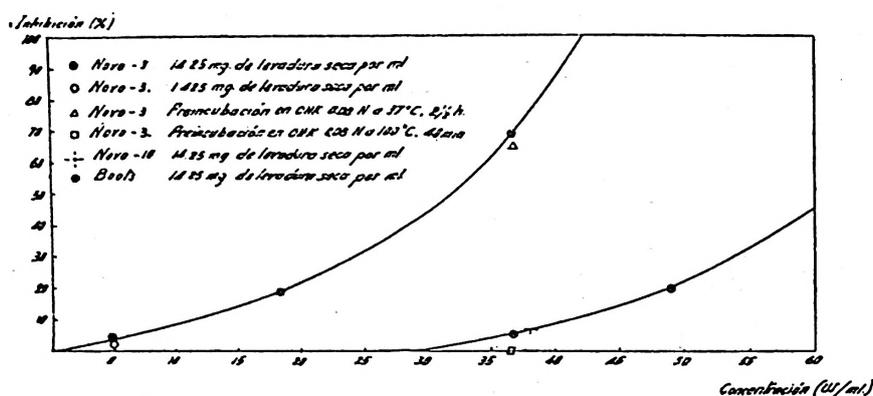


Fig 1

Acción de la insulina cristalizada sobre la respiración endógena en la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

CUADRO VIII

Acción de glucagón amorfo Lilly a pH 10, sobre la respiración endógena de la levadura a 30° C. Concentración de glucagón: 150 gammas/ml. Concentración de levadura: 14'25 mg./ml.

Tiempo	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con glucagón	Sin glucagón	Inhibición %
15 minutos	82	86	
	88	93	
	81	94'5	
Media	83'5	91	8
15 minutos	84	97	
	83'5	106	
	85	116	
Media	84	106	19'5

incubada con álcali a 37° C, sobre el consumo de oxígeno de la levadura. Puede comprobarse que el efecto inhibitor disminuye muy poco (fig. 1).

La insulina Novo-3 fué sometida también a un tratamiento alcalino más enérgico. Se mantuvo a ebullición en OHK 0'08 N durante 40 minutos. Según demostraron SUTHERLAND y CORI

*INHIBICION DE LA RESPIRACION ENDOGENA DE LA
LEVADURA POR INSULINA*

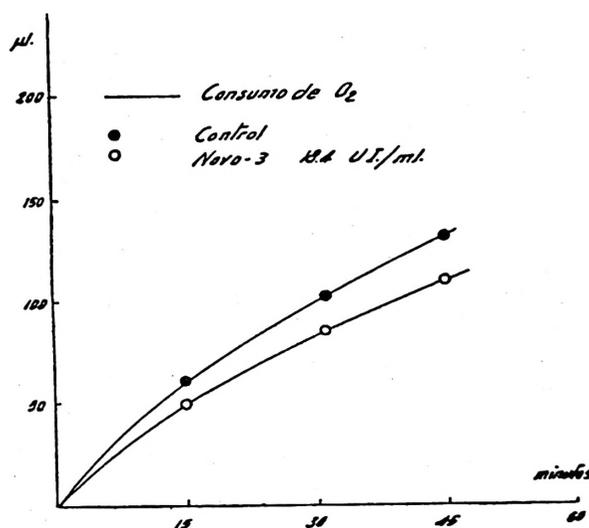


Fig. 2

Inhibición de la respiración endógena de la levadura por insulina.

(22), además de la acción insulínica, con la ebullición alcalina se desprende sulfhídrico, precipitan proteínas y desaparece la actividad del factor glucogenolítico (glucagón) ordinariamente acompañante. En el cuadro VIII se refiere el resultado obtenido con la insulina inactivada por ebullición alcalina. Puede comprobarse la completa desaparición del efecto inhibitor a los 15 minutos y un ligero aumento del consumo de oxígeno a la media hora (fig. 1).

En las mismas condiciones de las anteriores experiencias, se encontró que un glucagón amorfo Lilly carecía totalmente de efecto sobre la respiración endógena de la levadura hasta una concentración de 150 γ /ml. También se determinó que 75 γ /ml. de glucagón no aumentan el efecto inhibitor de 20 U. I./ml de insulina Novo-3.

*INHIBICION DE LA RESPIRACION ENDOGENA DE LA
LEVADURA POR INSULINA*

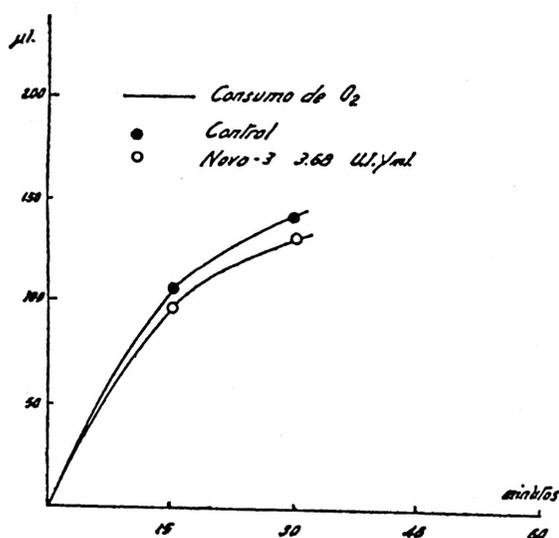


Fig. 3

Inhibición de la respiración endógena de la levadura por insulina.

Como el glucagón se precipita fácilmente en medio ácido, también se estudió su efecto sobre la respiración endógena de la levadura a pH 10. Se encontró que 150 γ /ml. poseían un marcado efecto inhibitor (cuadro VIII).

En el cuadro IX se señala que la concentración celular no influye sobre la inhibición de la respiración endógena de la

levadura por la insulina. La inhibición parece depender exclusivamente de la concentración absoluta de preparado insulínico (fig. 1).

CUADRO IX

Influencia de la concentración celular en la inhibición de la respiración endógena de la levadura por la insulina. Insulina Novo-3: 3'68 U. I. / ml.

Tiempo: 30 minutos			
Concentración de levadura	μl. de O ₂ absorbidos		
	Con insulina	Sin insulina	Inhibición %
14'25 mg./ml.	125	122'5	
	139	133	
	131	171	
	Media	132	
1'42 mg./ml.	15	20	8
	19	16	
	20	20	
	Media	18	
Tiempo: 60 minutos			
1'42 mg./ml.	—	29	
	23	23	
	24	25	
	Media	24	
			10

Discusión

Las distintas insulinas cristalizadas con las que se ha experimentado muestran un efecto inhibitor de la respiración endógena de la levadura. Este resultado concuerda con las investigaciones de CARRERE-COMES y CAPELLO (5). La acción es relativamente débil, puesto que son necesarias concentraciones muy elevadas de insulina para ponerlo de manifiesto. Sin em-

bargo, se han alcanzado inhibiciones del 70 %. La curva de inhibición es aproximadamente de tipo exponencial (fig. 1).

Así como ABDERHALDEN (1) no encontró correspondencia entre el efecto hipoglucemiante y la activación de la fermentación alcohólica de varias insulinas, nosotros tampoco encontramos un paralelismo con la inhibición de la respiración endógena. Esto sugiere que el factor inhibidor de la respiración no debe ser la propia insulina sino una substancia acompañante que se encuentre en distinta concentración en las muestras estudiadas. Sin embargo, dicha substancia debe ser la misma en todos los casos, de acuerdo con la superponibilidad de las curvas de inhibición obtenidas con insulinas de distinta procedencia como la Novo-3 y la Boots.

Como las dos insulinas Novo sólo difieren en el número de cristalizaciones, cabe considerar que la concentración del factor inhibidor de la respiración en las insulinas cristalizadas disminuye con la pureza de las mismas.

El hecho de que la insulina inactivada por incubación alcalina a 37° C continúe mostrando la misma acción inhibitoria sobre la levadura constituye una confirmación de que la hormona no es el agente que actúa sobre la respiración. En cambio, el factor inhibidor sería destruido por una ebullición alcalina durante 40 minutos (cuadro VII). Este comportamiento frente a los álcalis resulta muy sugestivo por su semejanza con el que manifiesta el factor hiperglucemiante, presente también de ordinario en la insulina (22) (24).

El glucagón podría ser efectivamente el agente responsable de la inhibición de la respiración de la levadura. No obstante, contrasta la ineffectividad del glucagón sólo. Tampoco puede pensarse en una acción sinérgica con la insulina, desde el momento que la adición de una cantidad de glucagón superior a la que puede llevar la insulina no es capaz de aumentar el efecto inhibitorio de la misma. Sin embargo, el glucagón amorfo ensayado inhibe la respiración de la levadura en medio alcalino. Esto permite suponer que la ausencia de efecto en medio ácido pueda ser debida a su precipitación. El glucagón que se encuentra junto a la insulina podía estar, en cambio, solubilizado de un modo u otro.

En el supuesto de que el glucagón fuese el factor causal de la inhibición de la respiración de la levadura y atendiendo a los valores de inhibición obtenidos con glucagón químicamente aislado (cuadro VIII), las insulinas ensayadas deberían contener una cantidad de este factor mucho mayor del que realmente pueden poseer. De hecho, la inhibición obtenida con glucagón amorfo a pH 10 no puede permitirnos una aprecia-

ción ni siquiera aproximada de la concentración de inhibidor en las insulinas ensayadas en un medio de pH 3-4, ya que las condiciones experimentadas no son comparables.

Realmente para admitir de una manera definitiva que el glucagón sea el factor inhibidor de la respiración de la levadura, será necesario poner de manifiesto una extensa correlación entre las propiedades hiperglucemiantes (4) (13) (17) (32) o glucogenolíticas (22) (24) y la inhibición de la respiración de la levadura.

El pequeño aumento del consumo de oxígeno producido con el hidrolizado alcalino a 100° C después de 1/2 hora (cuadro VII) es probablemente debido a la absorción del nitrógeno fácilmente utilizable resultante de dicha hidrólisis.

Resumen

Se parte de la posibilidad de que algunas contradicciones en los resultados de diversos estudios sobre la acción de la insulina sobre el metabolismo de la levadura, sean debidas a no haber tenido en cuenta la existencia del factor hiperglucemiante ordinariamente asociado a la hormona.

Con el método de WARBURG se investiga la influencia de dos insulinas cristalizadas NOVO, una BOOTS y un glucagón amorfo LILLY sobre el consumo de oxígeno de suspensiones lavadas de levadura en agua destilada.

Todas las insulinas ensayadas inhiben la respiración endógena de la levadura, pero no existe correlación entre actividad hipoglucemiante e inhibición del consumo de oxígeno. Con la pureza de la insulina disminuye su actividad inhibidora.

Se encuentra que las curvas de inhibición de dos insulinas distintas son superponibles y aproximadamente de tipo exponencial.

Los resultados anteriores se interpretan en el sentido de que el agente responsable del efecto inhibidor no es la insulina, sino un factor acompañante común a las distintas insulinas.

Para confirmar la hipótesis propuesta, se estudia el efecto de insulina inactivada por incubación alcalina, encontrándose que la actividad inhibidora de la respiración permanece prácticamente inalterada, en tanto que desaparece por completo el efecto hipoglucemiante.

Los autores sugieren que el factor inhibidor pueda ser el glucagón, puesto que dicho factor es igualmente destruido por ebullición alcalina. Sin embargo, a un pH de 3-4, un glucagón aislado químicamente no se muestra efectivo, ni es capaz de aumentar el efecto inhibidor de una de las insulinas ensayadas. No obstante, no se considera que este resultado excluya la posibilidad de que el glucagón asociado a la insulina sea realmente el factor inhibidor de la respiración, puesto que el glucagón actúa de inhibidor cuando el medio se hace alcalino (pH 10). Se sugiere que la ineffectividad del glucagón a pH ácido es debida a su precipitación.

También queda determinado que para un margen muy amplio, la inhibición de la respiración de la levadura no está influida por la concentración celular.

Summary

ACTION OF SOME CRYSTALYNE INSULINS AND ONE GLUCAGON ON THE ENDOGENOUS RESPIRATION OF YEAST

We assume the possibility that some contradictions in the results of diverse studies on the action of insulin on the metabolism of yeast, may be due to not having taken into account the existence of the hyperglucemic factor ordinarily associated with the hormone.

By the method of Warburg an investigation is made of the influence of two crystallised insulins of Novo, one of Boots, and an amorphous glucagon of Lilly on the consumption of oxygen of washed suspensions of yeast in distilled water.

All the insulins examined inhibited the endogenous respiration of the yeast, but no correlation exists between hypoglycemia-producing activity and inhibition of the consumption of oxygen. With the purity of the insulin the inhibitory activity is diminished.

It is found that the curves of inhibition of two different insulins can be superimposed, and are approximately of exponential type.

The former results may be interpreted in the sense that the agent responsible for the inhibitory effect is not insulin, but an accompanying factor common to different insulins.

To confirm the proposed hypothesis, the effect of insulin inactivated by alkaline incubation is studied, upon which it is found that the inhibitory activity of respiration remains practically unaltered while the hypoglycemia producing effect disappears completely.

The authors suggest that the inhibitory factor may be glucagon, as this factor is equally destroyed by alkaline boiling. However, at a pH of 3-4 a chemically isolated glucagon is not found to be effective, nor is it capable of augmenting the inhibitory effect of one of the insulins examined. Nevertheless it is not considered that this result excludes the possibility that the glucagon associated with insulin may be really the factor which inhibits respiration, as glucagon acts as inhibitor when the medium is made alkaline (pH 10). It is suggested that the ineffectiveness of glucagon in an acid pH is due to its precipitation.

It has also been determined that with a very wide margin, the inhibition of yeast-respiration is not influenced by cellular concentration.

Bibliografía

- (1) ABDERHALDEN, E. : *Fermentforschung*, **8**, 227, 1925.
- (2) ABDERHALDEN, E. : *Z. Physiol. Chem.*; **15**, 165, 1926.
- (3) BORNSTEIN, J. y TREWHELLA, P. : *J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **28**, 573, 1950.
- (4) BÜRGER, M. : *Klin. Wochschr.*, **16**, 361, 1937.
- (5) CARERE-COMES, O. y CAPELLO, M. : *Atti Soc. lombarda sci. med. e biol.*, **7**, 85, 1952.
- (6) FÜRTH, O. : *Biochem. Z.*, **150**, 265, 1924.
- (7) GEMMILL, C. L. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **66**, 232, 1940.
- (8) GEMMILL, C. L. y HAMMAN, L. : *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **68**, 50, 1941.
- (9) GOLDBLATT, M. W. : *Biochem. Jour.*, **23**, 243, 1929.

- (10) HECHTER, O., LEVINE, R. y SOSKIN, S. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; **46**, 390, 1941.
- (11) HERMANN, S. y NEIGER, R. : *Biochem. Z.*, **281**, 121, 1935.
- (12) IMSHENETZKII, A. A. : *Bull. Acad. Sci. U. R. S. S., Classe sc. math. nat.*, **10**, 1.559, 1932.
- (13) KIMBALL, C. P. y MURLIN, J. R. : *J. Biol. Chem.*; **58**, 337, 1923.
- (14) KRAHL, M. E. y CORI, C. F. : *J. Biol. Chem.*, **170**, 607, 1947.
- (15) KRAHL, M. E. y PARK, C. R. : *J. Biol. Chem.*, **174**, 939, 1948.
- (16) LEHMANN, H. : *Nature*, **141**, 690, 1938.
- (17) MARTINO, Q. : *Z. gen. exptl. Med.*, **103**, 771, 1938.
- (18) PERLMUTTER, M. y GREEP, R. O. : *J. Biol. Chem.*, **174**, 915, 1948.
- (19) ROSENTHAL, L. y KAMLET, J. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **37**, 650, 1938.
- (20) STADIE, W. C. y ZAPP, A. : *J. Biol. Chem.*, **170**, 55, 1947.
- (21) STADIE, W. C., HAUGAARD, N. y PERLMUTTER, M. : *J. Biol. Chem.*, **171**, 419, 1947.
- (22) SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F. : *J. Biol. Chem.*, **172**, 736, 1948.
- (23) SUTHERLAND, E. W. y DE DUVE, C. : *J. Biol. Chem.*, **175**, 663, 1948.
- (24) SUTHERLAND, E. W., CORI, C. F., HAYNES, R. y OLSEN, N. S. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 825, 1949.
- (25) TRAVELL, J. Q. y BEHRE, J. A. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **21**, 478, 1924.
- (26) VALORI, P. : *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **26**, 1, 1950.
- (27) VALORI, P. : *Arch. Sci. Biol.*, **36**, 142, 1952.
- (28) VILLEE, S. A. y HASTINGS, A. B. : *J. Biol. Chem.*, **179**, 673, 1949.
- (29) WALAAS, E. y WALAAS, O. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 367, 1952.
- (30) WEBER, A. P. : *Ann. Fermentations*, **3**, 15 y 65, 1937.
- (31) ZELLER, H. : *Biochem. Z.*, **176**, 134, 1926.
- (32) ZIMMERMANN, B. y DONOVAN, T. J. ; *Amer. Jour. Physiol.*, **153**, 197, 1948.

