

Grupos —SH de la lacticodehidrogenasa de hígado de pollo

C. Lluís y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Barcelona

(Recibido el 25 de abril de 1975)

C. LLUIS and J. BOZAL. *Thiol Groups of Chicken Liver LDH*. Rev. esp. Fisiol., 32, 1-8. 1976.

Crystallized chicken liver H₁ lactatedehydrogenase with PCMB and DTNB, proved to have six thiol groups per enzyme molecule. Sulphydryl groups seemed necessary for activity since the enzyme became inactive when the groups were blocked by PCMB, DTNB or by Zn (II), Cu (II) or Hg (II).

LDH inhibited by Hg (II) recovered its activity after treatment with β -mercapto-ethanol.

LDH reversible inactivation, caused by PCMB, was partially impeded by NAD, NADH and L-lactate but inactivation caused by DTNB was impeded in any way by coenzymes or substrates.

PCMB is a competitive inhibitor with the coenzymes but is non-competitive with the substrates whereas DTNB is a competitive inhibitor with NADH or L-lactate.

Kinetic studies of the DTNB inactivation suggest the possible formation of a DTNB-LDH-NADH complex.

The formation of LDH-NADH and LDH-NAD pyruvate inactive complexes have been detected by U.V. absorbancy measurements. Such inactive complexes have equally been observed experimenting with the PCMB or Hg (II) previously treated enzyme.

The results showed that these essential sulphydryl groups are not involved in the attaching of coenzymes or substrates to the chicken liver LDH molecule, but they seem to suggest the participation of —SH groups during the reversible hydrogen transfer between NADH and pyruvate.

El conocimiento del centro catalítico de las deshidrogenasas es bastante reducido a pesar de haber sido ampliamente estudiadas. La lactatodeshidrogenasa (LDH) de diversas procedencias y las deshidrogenasas, en general, contienen grupos —SH muy próximos al centro activo (11) que son esenciales para su actividad catalítica.

Las LDH de peces, de aves y de mamíferos poseen, por término medio, entre 16 y 21 grupos tiol por mol de enzima, aunque el número de los que exhiben mayor capacidad de reacción está comprendido entre 1 y 7.

La LDH de músculo pectoral de pollo, tratada por p-cloromercuribenzoato

(PCMB) o por iodoacetato, experimenta un decremento en su actividad que es proporcional al número de grupos —SH esenciales que han sido bloqueados (10). La presencia de los coenzimas, NAD o NADH (6), impide la reacción de la LDH con los reactivos de los grupos —SH, pero los sustratos no inducen el mismo efecto.

La destrucción de los grupos —SH, por fotooxidación (2), ocasiona un decremento correlativo en la unión del NADH a la LDH. Por otra parte, el bloqueo de los mencionados grupos por los iones Ag (I) y Hg (II) (17) provoca una inhibición de la actividad LDH que es más destacada que la inducida por el PCMB y el iodoacetato. Los hechos sugieren la intervención de los grupos —SH de la LDH en la unión con el coenzima (3) y el que manifiesten menor reaccionabilidad frente a algunos de sus reactivos bloqueadores específicos puede ser indicio de que su capacidad de unión con las moléculas de los coenzimas y aun de los sustratos se halla limitada.

Los análogos estructurales del NAD, sustituidos en C₄ del anillo de la nicotinamida, como son el NAD-CN y NAD-sulfito se unen a la molécula de LDH, pero cuando los grupos —SH esenciales del enzima se hallan en presencia de reactivos bloqueadores de —SH (12), la capacidad de unión de aquéllos al enzima se reduce de 10³ a 10⁴ veces, indicando la posible relación entre el mencionado átomo de carbono y los grupos —SH.

ADAMS *et al.* (1) postularon que el grupo tiol esencial (Cys 165) se halla situado a la distancia de 10-11 Å del centro activo de la LDH, correspondiente al sustrato, y a 6 Å del resto de Hys 195, que también es esencial.

Se ha procedido en el presente trabajo a la determinación del número de grupos —SH que resultan esenciales para la actividad catalítica de la LDH de hígado de pollo y la influencia que ejercen sobre la misma los reactivos específicos de los grupos tiol y los cationes Hg (II), Cu (II) y

Zn (II). Se pretende con ello determinar la intervención de los grupos tiol en la actividad catalítica de la LDH de hígado de pollo y su posible papel en la interacción enzima-coenzima.

Material y métodos

Se ha utilizado LDH de hígado de pollo cristalizada por el método propuesto por Lluís (14). La actividad específica del preparado es 555 U/mg proteína (1 unidad = Δ D.O./min). Cada gramo del purificado contiene 200 mg de proteína.

Como reactivos de los grupos —SH se han utilizado p-cloromercuribenzoato (PCMB) (Fluka); 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) (Calbiochem); N-etilmaleimida (NEM) (Aldrich-Europe); 2-mercaptoetanol (Merck); HgCl₂ (Merck) y CuCl₂·2H₂O, Pb(NO₃)₂, ZnSO₄·7·H₂O (U.C.B.).

La determinación espectrofotométrica de los grupos —SH enzimáticos, utilizando el PCMB como agente de valoración, se ha efectuado por el método de BOYER (4). La determinación colorimétrica de los grupos tiol con el reactivo DTNB se ha efectuado por el método de ELLMAN (7).

La actividad LDH se midió por lectura de los decrementos de D.O. a 340 nm del NADH, en un espectrofotómetro Beckman DBG-T, provisto de inscriptor, a la temperatura de 30 ± 0,1° C, en cubetas de 1 cm de paso de luz. Las concentraciones finales de piruvato y de NADH fueron de 3 × 10⁻⁴ M y de 1 × 10⁻⁴ M, respectivamente, y la reacción se inició por vertido del volumen de disolución de LDH, hasta completar el total de 3 ml. Las determinaciones de la actividad LDH se han efectuado en un medio tamponado de fosfato sódico 50 mM de pH = 7,4, salvo indicación específica.

Resultados

Inhibición de LDH por PCMB. El PCMB se comporta como inhibidor re-

versible de la LDH, en el sistema NADH-LDH-piruvato, cuando no se establece contacto previo entre el enzima y el reactivo bloqueador (fig. 1). Sin embargo, cuando se mantienen en contacto previo el PCMB y la LDH durante intervalos crecientes de tiempo, se observa el carácter irreversible o pseudoirreversible de la inhibición y que ésta es progresiva; en la figura 1 aparecen, también, los resultados obtenidos manteniendo en incubación previa la LDH y el PCMB.

La diálisis durante 24 horas, frente al

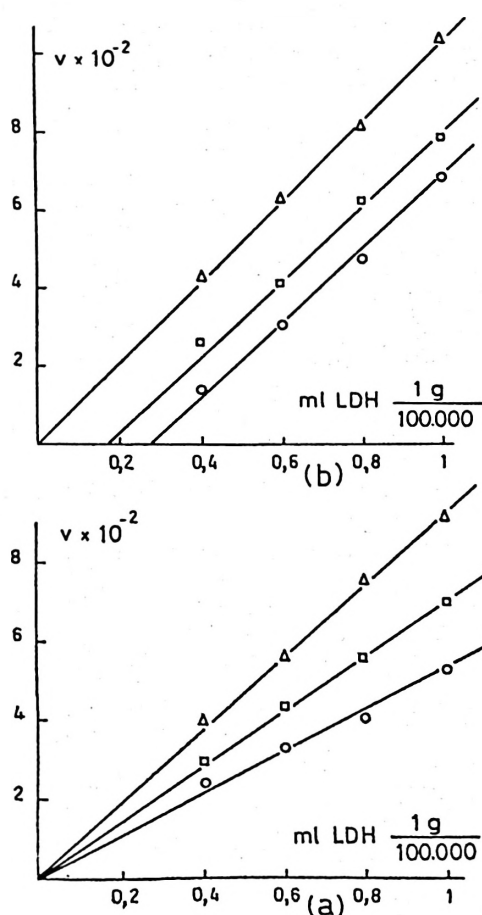


Fig. 1. Inhibición de LDH por PCMB.
a) Reversibilidad sin contacto previo LDH-PCMB; PCMB $M \times 10^4$: (O) 2; ($\square$) 1; (Δ) 0.
b) Irreversibilidad con contacto previo LDH-PCMB (30 minutos); PCMB $M \times 10^{-4}$: (O) 8; ($\square$) 2; (Δ) 0.

tampón de fosfato 50 mM y pH 7,4, de muestras de LDH (5 μ g en los 3 ml de incubado) preincubadas con PCMB 1×10^{-6} M, permite la recuperación de un 27 % de la actividad inicial y no se logra recuperación alguna cuando la concentración de PCMB es superior, confirmándose con ello el carácter irreversible de la inhibición inducida por el PCMB al establecer contacto previo con la LDH.

El β -mercaptoetanol no afecta a la actividad LDH; sin embargo, al actuar durante 30 minutos concentraciones de β -mercaptoetanol de 2×10^{-5} M y 1×10^{-4} M sobre muestras de LDH y PCMB (1×10^{-5} M y 5×10^{-5} M) preincubadas durante 60 minutos, se recupera parcialmente la actividad inhibida por el PCMB en un 43 y 66 %.

Debido al carácter reversible de la inhibición provocada por el PCMB cuando no se preincuba con la LDH, se ha determinado la naturaleza de la inhibición inducida en estas condiciones, para el sistema directo e inverso de la reacción (tabla I). La formación previa del complejo estable LDH-NADH no ejerce ningún efecto protector sobre la inhibición que induce el PCMB.

El NADH (2×10^{-4} M), el NAD (3×10^{-3} M) y el L-lactato (0,6 M) ejercen un ligero efecto protector de la inhibición provocada por el PCMB (1×10^{-5} M y 1×10^{-4} M) sobre concentraciones crecientes de LDH (60-100 μ g de purificado

Tabla I. Cinética de la inhibición producida por el PCMB.
5 g LDH purificada/3 ml incubado.

PCMB $M \times 10^4$	Substrato variable	Carácter de la inhibición	Constantes cinéticas $M \times 10^4$ K _{ip}	K _{ii}	K _{ML}
1	NADH	C	0,3		0,15
2	"				
1	Piruvato	NC	2,5	3,2	0,9
2	"				
1	NAD	C	1,5		2,5
2	"				
1	L-lactato	NC	2	6,9	20
2	"				

en los 3 ml de incubado) cuando no se preincuban el enzima y el inhibidor; el efecto protector desaparece cuando se establece entre ambos una preincubación de 80 minutos.

Valoración de grupos —SH con PCMB. La valoración de los grupos —SH de la LDH de hígado de pollo se ha realizado midiendo los incrementos de D.O. a 250 nm según la técnica de BOYER (*loc. cit.*). Las muestras de valoración contenían concentraciones crecientes de LDH, comprendidas entre 1×10^{-4} y $35,2 \times 10^{-2}$ mg LDH/ml, siendo la concentración final de PCMB, en todas ellas, de 1×10^{-5} M. El contacto previo entre la LDH y el PCMB se mantuvo durante intervalos de tiempo de 30 segundos y 15,30 y 45 minutos, a cuyo final se leyeron las D.O. utilizando como blanco una disolución que contiene la misma cantidad de enzima disuelto en el tampón de fosfato habitual. A los 30 minutos se valoran 5,6 grupos tiol por mol de LDH (fig. 2).

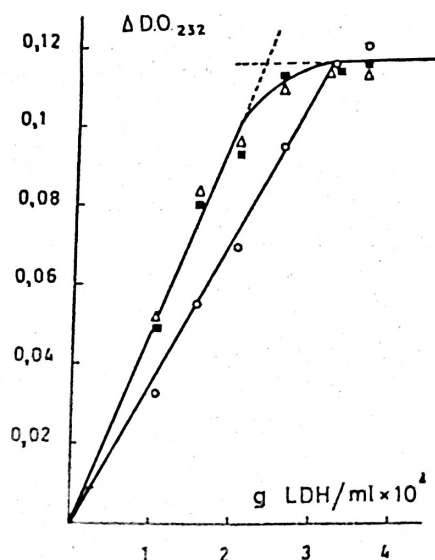


Fig. 2. Valoración de los grupos —SH con PCMB.
PCMB = 1×10^{-5} M; incubación LDH-PCMB:
(○) 15; (■) 30; (△) 45 (minutos).

Efecto del DTNB sobre la actividad LDH. El DTNB $1,68 \times 10^{-4}$ M, inhibe a la LDH (5 μ g de purificado en los 3 ml de incubado) un 94 % en el sistema NADH-LDH-piruvato en medio de tampón de fosfatos 50 mM de pH = 8. La inhibición es reversible, ya que muestras que contienen LDH y DTNB (2×10^{-4} M) en preincubación durante 24 horas y que están inhibidas un 100 %, recuperan un 73 % de su actividad inicial cuando se someten a diálisis frente al tampón de fosfatos habitual.

La cinética de la inhibición que provoca sobre la LDH, ensayada en el sistema directo e inverso, muestra carácter no competitivo respecto al NAD y al L-lactato, mientras que es competitivo respecto al NADH y al piruvato; los valores de las constantes de inhibición son los que se expresan en la tabla II.

La cinética de dicha inhibición utilizando el NADH como sustrato variable, pone de manifiesto la formación de un complejo inactivo LDH-NADH-DTNB, cuando la concentración de piruvato es saturante (3×10^{-4} M) (fig. 3). El incremento de la concentración de piruvato y la disminución de las concentraciones del inhibidor determina que el fenómeno vaya siendo cada vez menos acusado y en estas condiciones se mantiene el carácter de inhibidor competitivo respecto al NADH. No se observan variaciones en los resultados al trabajar con muestras de LDH y

Tabla II. Cinética de la inhibición producida por el DTNB.

5 g LDH purificada/3 ml incubado.					
DTNB M $\times 10^5$	Substrato variable	Carácter de la in- hibición	Constantes cinéticas M $\times 10^4$		
K _{II}	K _{IP}	K _{MI}			
5	NAD	NC	1,81	1,73	2,5
8	"	"			
5	L-lactato	NC	2,65	0,45	20
8	"	"			
8	Piruvato	C		0,65	0,9
10	"	"			
8	NADH	C		0,6	0,15
10	"	"			

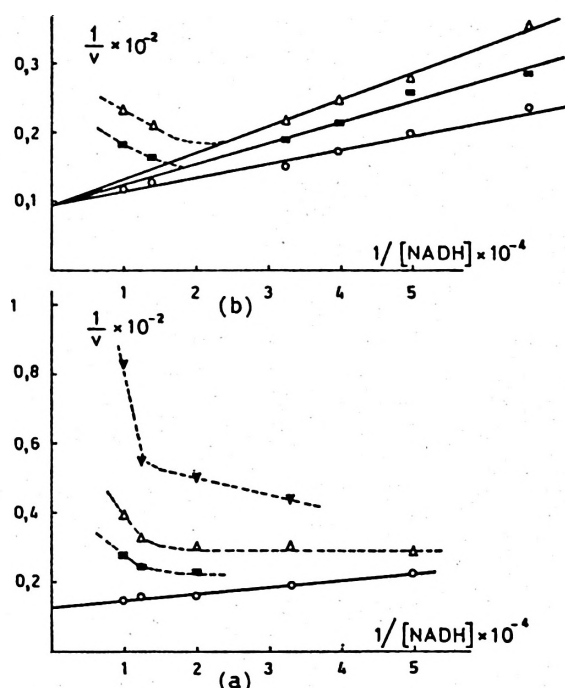


Fig. 3. Cinética de inhibición del DTNB con respecto al NADH.

a) Piruvato = 3×10^{-4} M; DTNB $M \times 10^{-5}$: (○) 0; (■) 1; (Δ) 1,2; (▼) 1,6. b) Piruvato = $1,5 \times 10^{-3}$ M; DTNB $M \times 10^{-5}$: (○) 0; (■) 1; (Δ) 10.

DTNB preincubadas durante 50 minutos.

Concentraciones superiores a las cinéticamente saturantes de los coenzimas o de los substratos no ejercen ningún efecto protector sobre la inhibición inducida por el DTNB sobre la LDH.

Valoración de grupos —SH con DTNB.

Se detectan 6 grupos tiol por mol de LDH cuando se utiliza el DTNB como agente de valoración según el método de ELLMAN (7). Se leyeron los incrementos de D.O. a 412 nm para muestras de LDH de concentración comprendida entre $5,65 \times 10^{-7}$ M y $11,3 \times 10^{-7}$ M (fig. 4).

Acción de cationes divalentes sobre la LDH. Al investigar la acción de ciertos cationes sobre la actividad de la LDH se observa que el Pb^{+2} (1×10^{-3} M) no ejerce ningún efecto inhibitor, mientras

que los iones Cu (II) y Zn (II) (1×10^{-3} M) inhiben la actividad LDH ($5 \mu g$ de purificado en los 3 ml de incubado) hasta un 80 %; en ambos casos la inhibición es progresiva.

El Hg (II) es un inhibidor muy potente de la actividad LDH; a pH 7,4 en medio de tampón tris-HCl 50 mM, el $HgCl_2$ (1×10^{-6} a 1×10^{-5} M) provoca una inhibición sobre la concentración de enzima anteriormente mencionada del 90 %. La preincubación del enzima con el catión determina el incremento de los porcentajes de inhibición; así, al establecer un contacto previo de 30 segundos entre ambos, se obtienen los mismos efectos con concentraciones del catión diez veces inferiores; y al preincubar el enzima durante 50 minutos, si la concentración del catión es de 10^{-8} M, se logra una inhibición completa.

Las muestras de LDH inhibidas por Hg (II) (10^{-8} M) apenas recuperan su actividad al ser dializadas frente al tampón mencionado y la recuperación es completa si la diálisis se efectúa frente a β -mercaptoetanol; el mismo efecto se consigue por adición del reactivo en la muestra que contiene el enzima inhibido.

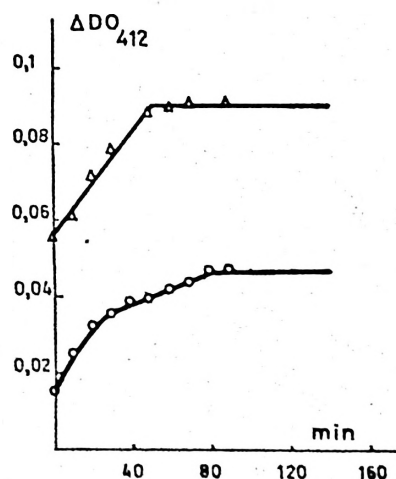


Fig. 4. Valoración de los grupos —SH con DTNB.

LDH $M \times 10^7$: (○) 5,65; (Δ) 11,3.

Formación de complejos binarios y terciarios en presencia de bloqueadores de los grupos —SH. Al incubar LDH con NADH se forma un complejo binario estable LDH-NADH (13). Se ha investigado la posible unión del NADH cuando la LDH se halla en presencia de PCMB o de Hg (II), agentes que, como se ha demostrado, bloquean los grupos tiol de la LDH de hígado de pollo.

Muestras de LDH (0,25 μ g de purificado/ml) preincubadas con NADH 1×10^{-4} M y PCMB 1×10^{-5} M y que se hallan, por tanto, muy inhibidas, muestran el mismo porcentaje de NADH remanente (35 %), al cabo de 24 horas de diálisis, que las muestras de la misma composición pero que carecen de PCMB.

Al trabajar con HgCl_2 3×10^{-7} M, las muestras que también estaban totalmente inhibidas antes y después de ser sometidas a diálisis, mostraban el 52 y 55 %, respectivamente, de NADH remanente al ser dializadas durante 24 horas.

EVERSE *et al.* (9) han postulado que el piruvato y el NAD en medio alcalino forman un aducto. En efecto, al determinar el espectro U.V. de mezclas de piruvato (1×10^{-2} M) y de NAD (8.4×10^{-4} M), a pH 10 (tampón bicarbonato NaOH 0.37 M), aparece un máximo a $\lambda = 340$ nm,

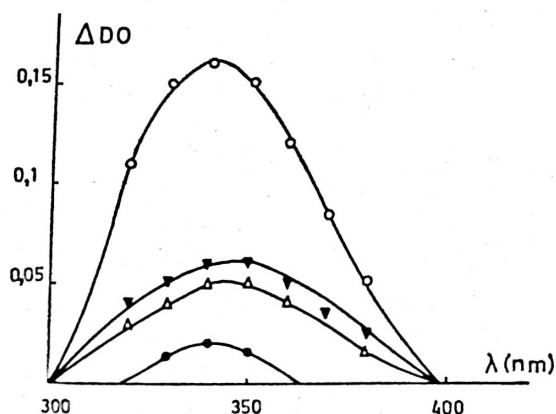


Fig. 5. Formación del aducto Piruvato-NAD. Tampón bicarbonatado —NaOH 0,034 M, pH = 10-Preincubación NAD-piruvato: (●) 15; (△) 30; (▼) 45; (○) 120 (minutos).

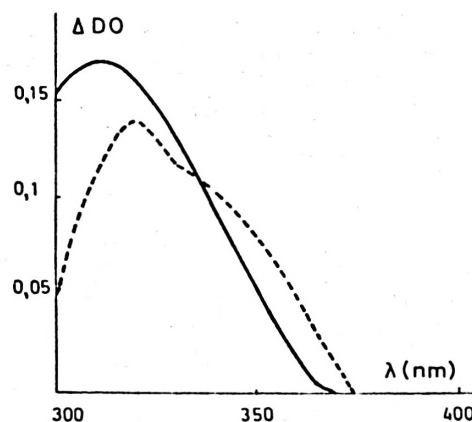


Fig. 6. Complejos inactivos de LDH. LDH $3,13 \times 10^{-4}$ M; NAD = $7,15 \times 10^{-2}$ M; piruvato = $11,9 \times 10^{-3}$ M. a) Complejo LDH-NAD-piruvato (—); b) Complejo LDH-NAD-piruvato-PCMB; PCMB = $1,88 \times 10^{-3}$ (---).

distinto del de ambas sustancias por separado (fig. 5). El fenómeno no ocurre si el pH se halla próximo a la neutralidad.

Al incubar mezclas que contienen LDH ($3,13 \times 10^{-4}$ M) y concentraciones análogas de piruvato y de NAD, a pH 7,6 (tampón tris-HCl 0,095 M) se observa un máximo a $\lambda = 320$ nm (fig. 6) y su aparición no depende del intervalo de preincubación de los substratos y del enzima o de la de éste con el NAD. Puede deducirse que se ha formado un complejo terciario inactivo LDH-NAD-piruvato.

Cuando se trabajó en las condiciones precedentes, pero con muestras de LDH que habían sido preincubadas con PCMB ($1,88 \times 10^{-3}$ M), también aparece un máximo en el espectro a $\lambda = 320$ nm (fig. 6), lo que indica que el complejo binario LDH-PCMB se une al piruvato y al NAD para formar el complejo cuaternario inactivo LDH-PCMB-NAD-piruvato.

Discusión

La LDH de hígado de pollo posee seis grupos —SH libres por mol, valorables con PCMB y DTNB. La actividad LDH resulta inhibida por el bloqueo de los grupos tiol, tanto por los mencionados reacti-

vos como por los cationes Cu (II), Zn (II) y especialmente por Hg (II), indicando la necesidad de que se hallen en estado libre para intervenir en el proceso catalítico.

Cuando el PCMB actúa como inhibidor reversible de la LDH, la inhibición es competitiva respecto al NAD y al NADH y no competitiva respecto al L-lactato y al piruvato, lo que podría indicar que los grupos —SH intervienen en la unión con el coenzima. Por otra parte, ambos coenzimas y el L-lactato protegen débilmente al enzima de la inhibición reversible inducida por el reactivo; el efecto protector desaparece cuando la LDH y el PCMB se preincuban, en cuyas condiciones la inhibición inducida por éste es irreversible.

El DTNB inhibe reversiblemente a la LDH, la inhibición es de naturaleza competitiva respecto al piruvato y al NADH y no competitiva respecto al L-lactato y al NAD, resultados que no apoyan la intervención de los —SH en la unión del coenzima al enzima. Por otra parte, ni los coenzimas ni los sustratos ejercen efecto protector de la inhibición inducida por el reactivo.

El que el β -mercaptoetanol no afecte a la actividad LDH constituye un indicio de la ausencia de uniones disulfuro.

La inhibición de la LDH de hígado de pollo por Hg (II) no se anula por diálisis, pero el enzima inactivado por el ion recupera toda su actividad por tratamiento con β -mercaptoetanol, indicando que la inhibición provocada por el catión no ha afectado a la estructura de la molécula enzimática.

Los estudios cinéticos ponen de manifiesto la formación del complejo LDH-NADH-DTNB. Asimismo, cuando los grupos —SH de la LDH se hallan bloqueados por PCMB o por Hg^{+2} se originan complejos terciarios con el NADH (LDH-NADH-bloqueador). Por otra parte, cuando se incuba el complejo LDH-PCMB con NAD y piruvato se demuestra la formación del complejo cuaternario LDH-

NAD-PCMB-piruvato. La existencia de los complejos comentados confirma que la unión de los coenzimas o de los sustratos a la molécula del enzima no se efectúa directamente a través de los grupos tiol.

El bloqueo de dichos grupos por los reactivos específicos pudiera determinar un impedimento espacial que limitase o impidiese los cambios de conformación necesarios que debe adoptar la proteína enzimática en su actuación catalítica. Se ha sugerido también que los grupos tiol se hallen involucrados en la transferencia de iones hidruro desde el coenzima a un grupo histidina del enzima que se halla próximo al residuo de cisteína esencial (16).

La transferencia del ion hidruro desde el coenzima al sustrato, con la intervención de un resto de histidina de la molécula de LDH, ha sido postulada por numerosos autores como el mecanismo químico de actuación de la LDH (5, 8, 9).

Considerando los resultados que se describen en este trabajo, se ha creído adecuado el proponer un mecanismo igual o similar al postulado por RABIN *et al.* (15) para otras deshidrogenasas, tal como aparece en la figura 7. El mecanismo propuesto estaría de acuerdo con la necesidad de la existencia de una forma protonizada en la molécula del enzima, justificaría además la posibilidad de formación de complejos binarios y ternarios en presencia de los bloqueadores de los grupos tiol, a la vez que facilitaría la transfe-

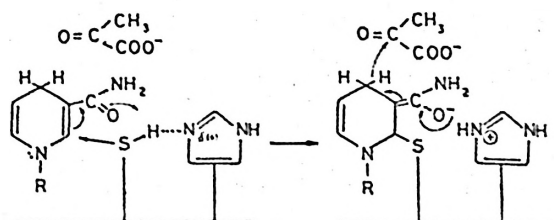


Fig. 7. Mecanismo de reacción de la LDH de hígado de pollo.

cia del ion hidruro hacia el sustrato y justificaría la necesidad de los grupos —SH en la actividad LDH.

Resumen

La valoración de LDH (H_2) cristalizada de hígado de pollo con PCMB o DTNB demuestra la existencia de seis grupos tiol por mol de enzima que son esenciales para la actividad, ya que su bloqueo por los citados reactivos o por Cu (II), Zn (II) y Hg (II) provoca la inactivación. La LDH inhibida por Hg (II) recupera su actividad al ser tratada por β -mercapto-etanol.

El NAD, el NADH y el L-lactato protegen débilmente a la LDH de la inhibición reversible inducida por el PCMB, mientras que los coenzimas o los sustratos no ejercen efecto protector alguno de la inhibición provocada por el DTNB.

La LDH es inhibida por PCMB competitivamente respecto a los coenzimas y no competitivamente respecto a los sustratos. La inhibición inducida por el DTNB es competitiva respecto al NADH y al piruvato y no competitiva respecto al NAD y al L-lactato. La cinética de inhibición del DTNB sugiere la existencia del complejo LDH-NADH-DTNB. La formación de los complejos inactivos LDH-NADH y LDH-NAD-piruvato se ha detectado por medida de la absorbancia (U.V.).

La existencia de los complejos se ha observado, también, al trabajar con el enzima previamente tratado con PCMB o Hg (II).

Los resultados indican que los grupos —SH esenciales no intervienen en la unión de los sustratos o los coenzimas a la molécula de LDH y sugieren su participación en la transferencia reversible del ion hidruro desde el NADH al piruvato.

Bibliografía

1. ADAMS, M. J., BUEHNER, M., CHANDRASEKHAR, K., FORD, G. S., MARCKERT, M. L., LILJAS, A., ROSSMANN, M. G., SMILEY, I. E., ALLISON, W. S., EVERSE, J., KAPLAN, N. O. y TAYLOR, S. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, **70**, 1968, 1973.
2. ALDESTEIN, H. J.: *Biochemistry*, **4**, 891, 1965.
3. BARRON, E. S.: *Advances in Enzymology*, **2**, 201, 1951.
4. BOYER, P. D.: *J. Am. Chem.*, **76**, 4331, 1954.
5. BUSH, K., MAHLER, H. R. y SHINER, V. J.: *Science*, **172**, 478, 1971.
6. DISABATO, G. y KAPLAN, N. O.: *Biochemistry*, **2**, 776, 1963.
7. ELLMAN, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 443, 1958.
8. EVERSE, J., BARNETT, R. E., THORNE, C. J. R. y KAPLAN, N. O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 444, 1971.
9. EVERSE, J., ZOLL, E. C., KAHAN, L. y KAPLAN, N. O.: *Biol. Org. Chem.*, **1**, 207, 1971.
10. FONDY, T. P., EVERSE, J., DRISCOLL, G. A., CASTILLO, F., STOLZENBACH, F. E. y KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 4219, 1965.
11. FONDY, T. P. y EVERSE, J.: *Fed. Proc.*, **23**, 424, 1964.
12. HOLBROOK, G. J. y STINSON, R. A.: *Biochem. J.*, **120**, 289, 1970.
13. LLUÍS, C., CORTÉS, A., GUBERT, S. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **28**, 309, 1972.
14. LLUÍS, C., GUBERT, S. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 223, 1975.
15. RABIN, J. y WHITERHERARD, P.: *Nature*, **196**, 658, 1962.
16. RINGOLD, H. J.: *Nature*, **210**, 535, 1966.
17. SINGER, T. P.: *Brewers. Diag.*, **42**, 1945.