

81. Die Stereospezifität der Alkoholdehydrogenase

von C. Bally und F. Leuthardt

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Zürich

(26. III. 70)

Summary. The glyceraldehyde formed by oxidation of glycerol through alcohol dehydrogenase (E.C. 1.1.1.1) from horse liver has been condensed with phosphodihydroxyacetone using either rabbit muscle or liver aldolase. The single product was identified after silylation by gas chromatography as L-sorbose-1-phosphate. No D-fructose-1-phosphate was detected. Apparently liver alcohol dehydrogenase oxidizes glycerol stereospecifically to L-(–)-glyceraldehyde. Thus, the earlier conclusions of *Hadorn et al.* from chromatography of the borate complexes on Dowex 1 have been confirmed. The same stereospecific behavior was found for both isoenzymes III and IV.

With Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide L-sorbose-1-phosphate and D-fructose-1-phosphate are persilylated. Two trimethylsilyl groups are bound to the phosphate group. These bonds are not cleaved during gas chromatography.

1. Einleitung. – In Rattenleber haben *Leuthardt & Wolf* [1] eine Dehydrogenase nachgewiesen, die Glycerin zu Glycerinaldehyd dehydriert. *Holzer & Schneider* [2] konnten zeigen, dass das Enzym mit der von *Bonnichsen & Wassén* [3] kristallisierten Leber-Alkoholdehydrogenase identisch ist. *Leuthardt & Wolf* [4] stellten fest, dass die Dehydrogenase den L-Glycerinaldehyd schneller hydriert, als den D-Glycerinaldehyd. *Hadorn et al.* [5] untersuchten in der Folge das Produkt der Dehydrierung von Glycerin genauer und fanden, dass fast nur L-Glycerinaldehyd gebildet wird. In einer weiteren, nicht veröffentlichten Arbeit aus unserem Institut fand *Bezzegh*, der die Methode von *Hadorn et al.* nur in einem Punkte änderte, wesentlich mehr D-Glycerinaldehyd als *Hadorn et al.* in ihrer früheren Arbeit gefunden hatten.

Die Leber-Alkoholdehydrogenase ist ein Dimeres. *Von Wartburg et al.* [6] bezeichnen die Untereinheiten mit A und B, die drei Isoenzyme, die sich durch verschiedene Untereinheitszusammensetzung auszeichnen, mit III (AA), IV (AB) und V (BB). *Pietrusko & Theorell* [7] konnten zeigen, dass die Steroidaktivität der Leber-Alkoholdehydrogenase der einen Untereinheit zuzuweisen ist, die sie mit S bezeichnen (S für steroidaktiv, identisch mit *von Wartburg's* Untereinheit B). Die andere Untereinheit A (A für äthanolaktiv) besitzt keine Steroidaktivität. Je nach Isoenzymanteil variiert die Steroidaktivität eines Isoenzymgemisches.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, nachzuweisen, ob der bei der Wiederholung der Versuche von *Hadorn et al.* aufgetretene Unterschied methodisch bedingt war und eventuell auf einer Epimerisierung des primär gebildeten Glycerinaldehyds beruht, oder ob er auf eine verschiedene Isoenzymzusammensetzung der verwendeten Enzympräparate zurückzuführen ist. In Anbetracht der etwas umständlichen Aufarbeitungsmethode von *Hadorn et al.*, die eine Epimerisierung oder einen Verlust des D-Enantiomeren auf irgend einer Stufe nicht völlig ausschliessen liess, hielten wir es für angezeigt, die Versuche mit einer verbesserten, direkteren Methode noch einmal aufzunehmen.

2. Material, Apparate. – Glycerin *puriss. p.a. Fluka AG* Buchs. NAD^+ , Aldolase aus Kaninchenmuskel und Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase, alle von *Boehringer*, Mannheim. Phosphodihydroxyaceton-dimethylketal-dicyclohexylammoniumsalz (synthetisiert nach *Ballou & Fischer* [8])¹⁾ wurde in *Aqua bidest.* gelöst, mit einem *Dowex 50* (H^+ -Form) Kationenaustauscher behandelt, 4 Std. bei 40° hydrolysiert, neutralisiert, lyophilisiert und in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst. *D*-Fructose-1-phosphat-Bariumsalz wurde von *Boehringer*, Mannheim, bezogen. *L*-Sorbitose-1-phosphat-Bariumsalz wurde aus dem Diaceton-Derivat der *L*-Sorbitose synthetisiert²⁾. Die Ketose-1-phosphatbestimmungen wurden nach *Racker* [9] durchgeführt. Silyliermittel: Regisil+TMCS (BSTFA+1% TMCS³⁾, *Regis, Chemical Co.*, Chicago.

Gas-Chromatograph: Fractovap Model D, *Carlo Erba*, Milano, mit Flammenionisationsdetektor. Glaskolonne 80 cm lang, 2 mm innerer Durchmesser, mit TMCS vorbehandelt. 1,5% OV-17 (*Applied Science*, State College, Pa.) auf mit HMDS⁴⁾ behandeltem Chromosorb W (*Johns Manville*) 80/100 mesh. Temperaturen: Kolonne 175°C , Injektor 210°C , Detektor 210°C . Gasfluss: Trägergas N_2 25 ml/min, H_2 33 ml/min, O_2 260 ml/min.

Gas-Chromatograph/Massenspektrometer: LKB 9000 (*LKB*, Bromma, Schweden). Glaskolonne 2 m lang, 3 mm innerer Durchmesser, mit TMCS vorbehandelt. 1,5% OV-17 auf nicht vorbehandeltem Chromosorb W (*Johns Manville*), 80/100 mesh. Temperaturen: Kolonne 170°C , Injektor 230°C , Separator 250°C , Ionenquelle 270°C . Trägergas He, 20 ml/min. Elektronenenergie 70 eV. Beschleunigungsspannung 3,5 kV⁵⁾.

3. Methoden. – 3.1. *Gas-Chromatographie*. Um den durch Dehydrierung des Glycerins entstandenen Glycerinaldehyd zu identifizieren, kondensierten wir ihn nach der Methode von *Hadorn et al.* durch Aldolase mit Phosphodihydroxyaceton, trennten aber die entstandenen Ketose-1-phosphate ohne sie zu hydrolysieren in persilylierter Form durch Gas-Chromatographie.

Als erste beschrieben *Wells et al.* [10] 1964 die gas-chromatographische Darstellung von Zuckerphosphaten. Sie veresterten den Phosphorsäurerest zuerst mit Diazomethan und silylierten den Ester mit einem Gemisch von Pyridin, HMDS und TMCS 10:2:1. *L*-Sorbitose-1-phosphat und *D*-Fructose-1-phosphat liessen sich so nicht befriedigend nachweisen, da ihre Pike wegen der kurzen Retentionszeiten der Ketosephosphate in den abfallenden Lösungsmittelpik (Pyridin) zu liegen kamen. Diesem Nachteil kann mit der Methode von *Ellis* [11] begegnet werden, der Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet. *Hashizume & Sasaki* [12] erhielten befriedigende Resultate ohne vorangehende Veresterung der Phosphorsäurereste, durch direkte Silylierung mit einem 4:2:1-Gemisch von Pyridin, HMDS und TMCS. Sie folgerten aus dem Auftreten eines Piks mit gleicher Retentionszeit wie Phosphorsäure, dass ein Teil der Phosphatreste abgetrennt werde. *Horning et al.* [13] ersetzten das Pyridin/HMDS/TMCS Silyliergemisch durch BSA⁶⁾, das ihnen als Lösungs- und Silyliermittel diente, und verwendeten hitzestabilere flüssige Phasen (OV-1, OV-17). Beim Stehenlassen ihrer Ansätze beobachteten sie bei Raumtemperatur nach einigen Tagen Hydrolyse der silylierten Verbindungen. *Eisenberg & Bolden* [14], die ein Pyridin/HMDS/TMCS-Gemisch 5:1:1 verwendeten, kondensierten das silylierte Glucose-6-phosphat beim Austritt aus der Gas-Chromatographiekolonne in einer mit Glaswolle

¹⁾ Von Herrn Dr. *Th. Bezzegh* synthetisiert.

²⁾ Von Fräulein *D. Tennenbaum* synthetisiert.

³⁾ Bistrimethylsilyltrifluoroacetamid, Trimethylchlorsilan.

⁴⁾ Hexamethyldisilazan.

⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. *Chan*, Gerichtsmedizinisches Institut der Universität Zürich, für die Aufnahme der Massenspektren.

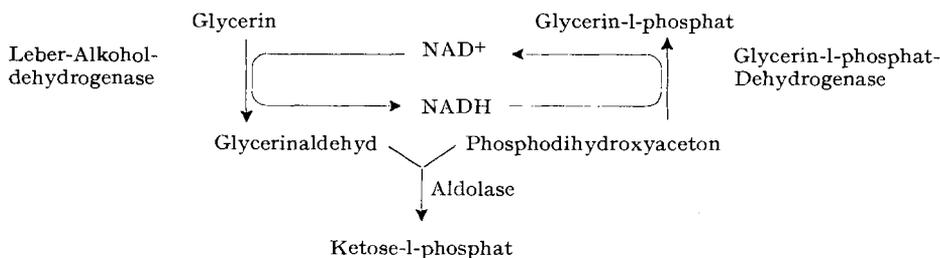
⁶⁾ Bistrimethylsilylacetamid.

gefüllten Kolonne. Aus der Untersuchung des kondensierten Materials zogen sie den Schluss, dass die Phosphatgruppe unsubstituiert bleibt und bei Kontakt mit Luftfeuchtigkeit zu einer Säurehydrolyse der Trimethylsilyl-Ätherbindungen führt. Bei Glucose-1-phosphat und Galaktose-1-phosphat gelang es ihnen nicht, den phosphorylierten Zucker zu kondensieren. Im Gegensatz zu *Hashizume & Sasaki* konnten sie aber keinen ihrer Pike mit Phosphorsäure identifizieren. Dafür nehmen sie an, dass es sich bei den im Zusammenhang mit diesen zwei Zuckerphosphaten zur Darstellung gebrachten Pike um noch unbekannte Anhydride handelt.

Curtius et al. [15] konnten freie Fructose gas-chromatographisch in fünf Pike auftrennen, denen sie mit Hilfe von IR.- und MS.-Spektren die Formen α - und β -Furanose, α - und β -Pyranose und die Ketoform zuweisen konnten.

3.2. *Durchführung der Versuche.* 3.2.1. *Frühere Methoden.* *Hadorn et al.* und *Bezzegh* kondensierten, wie oben erwähnt, den entstandenen Glycerinaldehyd mit Phosphodihydroxyaceton zu den entsprechenden Ketose-1-phosphaten. Nach saurer Hydrolyse dieser Ketosephosphate trennten sie die freien Zucker als Boratkomplexe auf einer Anionenaustauschersäule (*Khym & Zill* [16]). Um störende Faktoren (wie Epimerisierung) auszuschliessen, suchten wir die Methode zu vereinfachen. Wir versuchten das Verhältnis D- zu L-Glycerinaldehyd auf der Stufe des Aldehyds direkt zu bestimmen, was uns aber nicht gelang, so dass wir uns auf den gas-chromatographischen Nachweis des Verhältnis auf Stufe der Ketose-1-phosphate festlegten. Im Hinblick auf die Arbeit mit Isoenzymen, die zum Teil nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehen, mussten die Ansätze auf das kleinstmögliche Volumen reduziert werden. Ein 1-ml-Ansatz liess sich noch gut verarbeiten. Im Folgenden beschreiben wir die experimentellen Einzelheiten.

3.2.2. *Standardansatz.* Glycerin wurde in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 in Gegenwart von NAD⁺ mit Phosphodihydroxyaceton, Leber-Alkoholdehydrogenase und Muskelaldolase inkubiert. Um das bei der Bildung des Glycerinaldehyds reduzierte Coenzym wieder zu oxydieren, wurde dem Versuchsansatz ausserdem noch Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase zugegeben. Die drei Enzyme wurden vor dem Versuch 3 × 4 Std. gegen ihr tausendfaches Volumen 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 dialysiert. Alle Ansätze enthielten Komplexon III. (Siehe Tabelle) Schema:



Der Ansatz wurde 2 Std. bei 40°C inkubiert, dann mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 6%) enteiwesst und anschliessend zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung der Trichloressigsäure sechsmal mit seinem Volumen peroxidfreiem, wassergesättigtem Äther geschüttelt. Die Lösung wurde dann auf eine *Dowex-50*-Säule (H⁺-Form) aufgetragen und mit *Aqua bidest.* eluiert. Das Eluat wurde in einem Schliffröhrchen lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 0,2 ml Regisil + TMCS gelöst, stark geschüttelt und zur Silylierung 2 Std. bei 50°C im Wärmeschrank stehengelassen. Von dieser Lösung wurden Proben für die Gas-Chromatographie und die kombinierte Gas-

Zusammensetzung des enzymatischen Ansatzes

Die in der Tabelle angeführten Mengen waren in 1 ml 0,05M Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst

	Menge in mg	Konzentration im Ansatz in mM	Enzymaktivität in IE
Glycerin	1,4	15	
Phosphodihydroxyaceton	1,7	10	
NAD ⁺	0,33	0,5	
Komplexon III	0,5	1,3	
Leber-Alkoholdehydrogenase	1,5		4 ^{a)}
Aldolase	0,5		4,5 ^{b)}
Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase	0,2		8

^{a)} gemessen mit Äthanol als Substrat

^{b)} gemessen mit Fructose-1,6-diphosphat als Substrat

Chromatographie/Massenspektrometrie verwendet. Unter Ausschluss der Luftfeuchtigkeit sind die silylierten Zuckerphosphate während einiger Wochen stabil.

3.2.3. *Trennung der Isoenzyme.* Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (*Boehringer*, Mannheim) wurde auf einer Carboxymethyl-Cellulose-Säule in seine Isoenzyme aufgetrennt. Der Aktivitätsanteil von Isoenzym III (AA) und Vorläufern [6] beträgt 99%. 1% der Aktivität entfällt auf Isoenzym IV (AB). Die Aktivitätsmessung erfolgte bei 24°C, 366 nm und 1 cm Schichtdicke in einem Ansatz folgender Zusammensetzung: $1,7 \cdot 10^{-2}$ M Äthanol, $1,7 \cdot 10^{-3}$ M NAD⁺ und $3,3 \cdot 10^{-2}$ M Na-Pyrophosphat pH 8,8 [17]. Das unbehandelte *Boehringer*-Präparat und die Isoenzyme III und IV wurden auf Stärkegel nach *Smithies* [18] einer Elektrophorese unterzogen (Fig. 1). Gelpuffer: Tris-

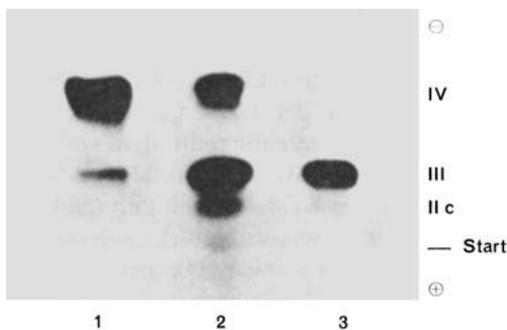


Fig. 1. Stärkegelelektrophorese von Leber-Alkoholdehydrogenase

Tris-HCl Puffer pH 8,5

1: gereinigtes Isoenzym IV; 2: *Boehringer*-Präparat; 3: gereinigtes Isoenzym III

Die Farbintensität der Flecke in 2 ist kein direktes Mass für die Aktivität

HCl 0,025 M, pH 8,5. Kammerpuffer: Tris-HCl 0,3 M pH 8,5. Die Elektrophorese wurde mit 20 V/cm während 5 Std. bei 4°C Umgebungstemperatur durchgeführt. Alkoholdehydrogenase-Aktivitätsfärbung durch Inkubation der Gele bei 37°C in einer wässrigen Lösung, enthaltend 0,42 mg/ml Nitrotetrazoliumblau-chlorid, 0,05 mg/ml Phenazinmethosulfat, $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Äthanol und $1,25 \times 10^{-3}$ M NAD⁺ [19].

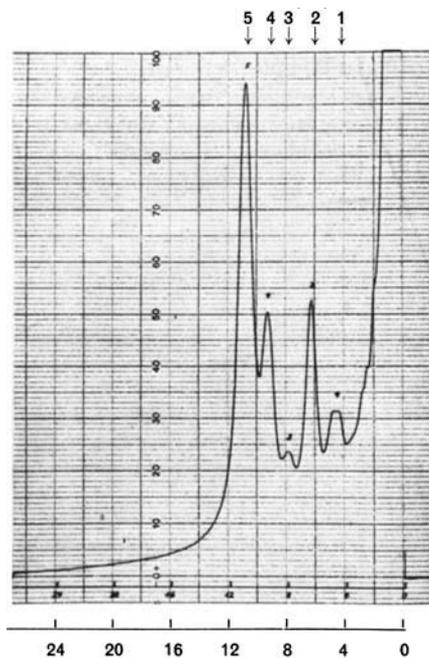


Fig. 2. Gas-Chromatogramm von silyliertem L-Sorbose-1-phosphat, das enzymatisch in einem mit Iso-enzym IV inkubierten Ansatz gebildet wurde.

Die gas-chromatographischen Bedingungen sind im methodischen Teil erwähnt. Abszisse: Zeit in min.

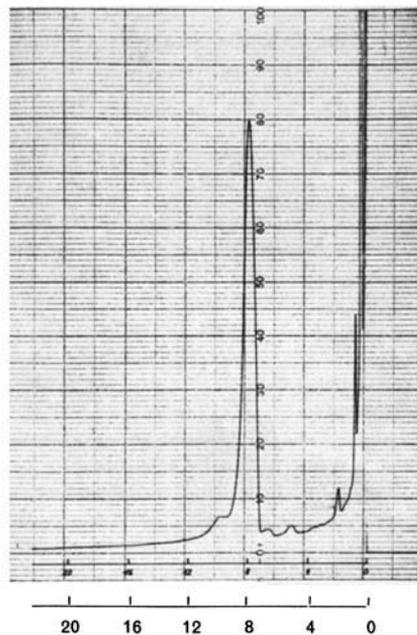


Fig. 3. Gas-Chromatogramm von silyliertem D-Fructose-1-phosphat.

Die Retentionszeit des Hauptpiks ist gleich der Retentionszeit von Pik 3 des L-Sorbose-1-phosphates. Die gas-chromatographischen Bedingungen sind im methodischen Teil erwähnt. Abszisse: Zeit in min.

4. Resultate. – Die Massenspektren aller 5 Pike aus Fig. 2 und des Hauptpiks aus Fig. 3 zeigen ein Molekel-Ion von der Masse 692,5. Das Verhältnis der wichtigsten niedrigen Massenzahlen zueinander entspricht den von Curtius *et al.* gefundenen Werten. L-Sorbose-1-phosphat ergab bei verschiedenen gas-chromatographischen Bedingungen jeweils 4 bis 5 Pike. Es stellte sich nun die Frage, ob eventuell ein Teil der Pike nur partiell silylierten Formen entspräche, oder ob die Pike furanosiden bzw. pyranosiden Strukturen zuzuweisen seien. Die gefundenen Molekel-Ionen mit der Masse 692,5 kommen durch eine Persilylierung der Ketose-1-phosphate mit 6 Trimethylsilyl(TMS)-Gruppen zustande. 4 TMS-Gruppen sind durch Ätherbindungen mit dem Zucker verbunden, die restlichen 2 liegen am Phosphatrest. Da die Verhältnisse der Signale grösster Intensität sich in den einzelnen Piken entsprechend den von Curtius *et al.* gefundenen Werten verhalten, folgern wir, dass es sich bei den in den 5 Piken zur Darstellung gelangten Formen um persilylierte α - und β -Furanose, α - und β -Pyranose und die freie Ketoform des L-Sorbose-1-phosphates handelt.

Die Versuche mit dem Boehringer Leber-Alkoholdehydrogenase-Präparat, mit reinem Isoenzym III und reinem Isoenzym IV ergaben alle das gleiche Resultat. Fig. 2 zeigt das Ergebnis eines mit Isoenzym IV durchgeführten Versuches. Es konnte

nur L-Sorbose-1-phosphat nachgewiesen werden, das heisst, der bei der Dehydrierung des Glycerins entstehende Aldehyd ist der L-(–)-Glycerinaldehyd. Reines L-Sorbose-1-phosphat ergibt das gleiche Bild wie Fig. 2. Fig. 3 zeigt reines D-Fructose-1-phosphat. Fig. 4 zeigt das Ergebnis eines Versuches, dem vor der Silylierung 5% D-Fructose-1-

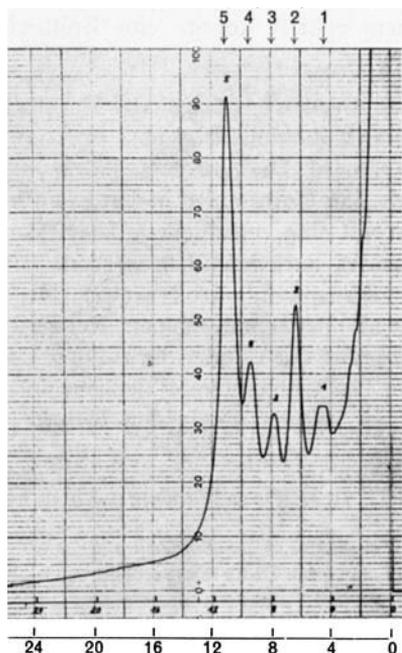


Fig. 4. Gas-Chromatogramm von enzymatisch gebildetem, silyliertem L-Sorbose-1-phosphat, dem vor der Silylierung 5% D-Fructose-1-phosphat, bezogen auf das im Ansatz gebildete Ketose-1-phosphat, zugegeben wurde.

Man erkennt die Erhöhung von Pik 3. Die gas-chromatographischen Bedingungen sind im methodischen Teil erwähnt. Abszisse: Zeit in min.

phosphat, bezogen auf das im Ansatz gebildete Ketose-1-phosphat, zugegeben wurde. Ansätze mit folgender Änderung gegenüber dem Standardansatz führten zum gleichen Ergebnis: Ersatz des Phosphatpuffers durch Trispuffer, Ersatz der Kaninchen-Muskelaldolase durch Kaninchen-Leberaldolase, pH des Versuchsansatzes 8,4 statt 7,5 und Ersatz des Phosphodihydroxyacetons durch Fructose-1,6-diphosphat: Phosphodihydroxyaceton entsteht hier während der Inkubation durch Aldolase-wirkung.

Die Kondensation von DL-Glycerinaldehyd mit Phosphodihydroxyaceton durch Aldolase ergab ein Gemisch von L-Sorbose-1-phosphat und D-Fructose-1-phosphat im Verhältnis 1:1. In unserem Versuchsansatz wird der entstehende Glycerinaldehyd unmittelbar mit Phosphodihydroxyaceton zu Ketose-1-phosphat kondensiert. Glycerinaldehyd liegt also nie in grösseren Mengen vor. Um diesen Bedingungen näher zu kommen als mit einer einmaligen Zugabe von DL-Glycerinaldehyd wurde in einem zweiten Versuch die gleiche Menge DL-Glycerinaldehyd in 60 Portionen in Abständen von einer Minute zugesetzt. Es ergab sich das gleiche 1:1-Verhältnis.

Die Schritte zwischen der Enteiweissung des Ansatzes und der Silylierung zeigten nur kleine Ketose-1-phosphat-Verluste, die für beide Zucker gleich waren. Der Gesamtverlust betrug zwischen 10 und 15%. Im Mittel fanden wir nach den einzelnen Schritten folgende Ausbeuten an Ketose-1-phosphat in % der zugegebenen Menge:

Nach Enteiweissung	100%
Nach Ätherextraktion	98%
Nach Kationenaustauscherbehandlung	97%
Nach Lyophilisation	88%

Die Reaktionsschritte der Aufarbeitung nach *Hadorn et al.* und *Bezzegh* wurden mit L-Sorbose-1-phosphat durchgeführt. Bei keinem Schritt konnte eine Epimerisierung nachgewiesen werden.

5. Diskussion. – Die Resultate der verschiedenen Ansätze bestätigen das Resultat von *Hadorn et al.*, wonach Glycerin durch die Leber-Alkoholdehydrogenase praktisch ausschliesslich zu L-(–)-Glycerinaldehyd dehydriert wird. Die einzelnen Isoenzyme liefern das gleiche Enantiomer des Glycerinaldehyds. Der Unterschied in den Resultaten von *Hadorn et al.* und *Bezzegh* kann also nicht auf eine verschiedene Isoenzymzusammensetzung des verwendeten Enzympräparates zurückgeführt werden. Die Versuche, in denen wir DL-Glycerinaldehyd mit Phosphodihydroxyaceton durch Aldolase kondensiert haben und ein 1:1-Verhältnis der entstandenen Ketose-1-phosphate gefunden haben, lassen uns eine Bevorzugung der D- oder der L-Form des Glycerinaldehyds in dieser Reaktion ausschliessen. Die Untersuchung der einzelnen Schritte unserer Aufarbeitung zeigte, dass sich bei keinem die beiden Ketose-1-phosphate verschieden verhalten.

Den Herren PD Dr. *H. C. Curtius*, PD Dr. *K. Grob* und PD Dr. *J. P. von Wartburg* möchten wir für ihre Anregungen bestens danken.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* durchgeführt, dem wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen möchten.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *F. Leuthardt & H. P. Wolf*, *Helv.* **36**, 1463 (1953).
- [2] *H. Holzer & S. Schneider*, *Klin. Wschr.* **33**, 1006 (1955); *Angew. Chem.* **67**, 276 (1955).
- [3] *R. K. Bonnicksen & A. M. Wassén*, *Arch. Biochemistry* **18**, 361 (1948).
- [4] *F. Leuthardt & H. P. Wolf*, *Helv.* **37**, 1732 (1954).
- [5] *B. Hadorn, F. Leuthardt, E. Ménard & D. Vischer*, *Helv.* **46**, 2003 (1963).
- [6] *J. P. von Wartburg, P. M. Kopp & U. M. Lutstorf*, *Proceedings of the 5th Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc.*, Prague, July 1968, im Druck.
- [7] *R. Pietruszko & H. Theorell*, *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 288 (1969).
- [8] *C. E. Ballou & H. O. L. Fischer*, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1659 (1956).
- [9] *E. Racker*, *J. biol. Chemistry* **167**, 843 (1947).
- [10] *W. W. Wells, T. Katagi, R. Bentley & C. C. Sweeley*, *Biochim. biophys. Acta* **82**, 408 (1964).
- [11] *W. C. Ellis*, *J. Chromatogr.* **41**, 325 (1969).
- [12] *T. Hashizume & Y. Sasaki*, *Analyt. Biochemistry* **15**, 346 (1966).
- [13] *M. G. Horning, E. A. Boucher & A. M. Moss*, *J. Gas Chromatogr.* **5**, 297 (1967).
- [14] *F. Eisenberg & A. H. Bolden*, *Analyt. Biochemistry* **29**, 284 (1969).
- [15] *H. C. Curtius, M. Müller & J. H. Völlmin*, *J. Chromatogr.* **37**, 216 (1968).
- [16] *J. X. Khym & P. Zill*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2090 (1952).
- [17] *J. Papenberg, J. P. von Wartburg & H. Aebi*, *Biochem. Z.* **342**, 95 (1965).
- [18] *O. Smithies*, *Biochem. J.* **71**, 585 (1959).
- [19] *K. Moser, J. Papenberg & J. P. von Wartburg*, *Enzym. Biol. Clin.* **9**, 447 (1968).