Über den Einfluss ultraniedriger Temperaturen auf verschiedene biologische Erscheinungen.

II. Mitteilung.

Beeinflussung der Glykolyse durch ultraniedrige Temperatur.

Von

Sentaro Kusaka.

(日下千太郎)

(Aus der Medizinischen Klinik von Prof. Dr. T. Kato,
Kaiserliche Tohoku-Universität zu Sendai.)

Es ist eine als sog. Hämoglykolyse bekannte Erscheinung, dass der Blutzucker, wenn man Blut ausserhalb des Körpers stehen lässt, rasch abnimmt und die Milchsäure zunimmt. Wie man glaubt, tritt diese Erscheinung nicht durch Zutritt von Bakterien aus der Aussenwelt, sondern durch glykolytische Fermente ein. Ich habe in der 1. Mitteilung den Einfluss ultratiefer Kälte auf die Fermente untersucht und festgestellt, dass durch ultratiefer Kälte die Wirkung von Diastase und Pepsin nicht beeinflusst wird, während die der Katalase, wenn auch in geringstem Masse gesteigert wird. Von hohem Interesse ist es zu untersuchen, was für einen Einfluss ultraniedrige Temperaturen auf die Hämoglykolyse ausüben; da aber hierüber bisher keine Versuche gemacht wurden, wurde die vorliegende Untersuchung angestellt.

Versuchsmethode. Das zu untersuchende Blut wurde gesunden Kaninchen aus der A. carotis entnommen und in Kolben eingebracht. Um die Gerinnung des Blutes zu hemmen, wurden Glasperlchen in die Kolben getan und das Blut durch Schütteln defibriniert.

Darüber, ob gerinnungshemmende Substanzen irgendeinen Einfluss auf die Hämoglykolyse ausüben, liegen in der Literatur Angaben einiger Autoren vor: Kawamura¹⁾ teilte mit, dass die Glykolyse durch Kaliumoxalat, Natriumoxalat, Natriumfluorid, Bariumchlorid und Calciumchlorid gehemmt wird, während sie durch Natriumcitrat keineswegs beeinflusst wird. Aibara²⁾ meinte aber, dass die Glykolyse durch Fluornatrium und Kaliumoxalat, selbst in sehr dünnen Lösungen, stark und durch Natriumcitrat ein wenig gehemmt wird. Nach Bürger³⁾ halten auch gerinnungshemmende Zusätze die Glykolyse auf.

Darum ist hier der Gebrauch irgendeines gerinnungshemmenden Mittels umgegangen. Beim Einwirkenlassen ultratiefer Kälte wurde das Blut in einen hartgläsernen Kolben eingebracht, und dieser wurde in eine flüssigen Stickstoff enthaltende, breitmündige Thermosflasche hineingelegt. Wenn der flüssige Stickstoff vollkommen aufgehört hatte zu siedeln, wurde der Kolben noch 10 Minuten lang in ihm stehen gelassen, damit die ultratiefe Kälte von -196°C ausreichend einwirken konnte. Dann wurde der Kolben herausgenommen, und das Versuchsmaterial wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut. Das oben geschilderte Verfahren wurde selbstverständlich unter streng aseptischen Kautelen ausgeführt. Die Blutmilchsäure wurde nach von Inawashiro u. Hayasaka⁴⁾ in hiesiger Klinik modifizierter Methode von Anrep u. Cannan⁵⁾ gemessen, während die Blutzuckerbestimmung nach der Methode von Hagedorn u. Jensen⁶⁾ ausgeführt wurde.

1. Beeinflussung des Blutzuckers und der Blutmilchsäure durch ultratife Kälte.

Es wurde zuerst der Blutzucker- und -milchsäurespiegel des defibrinierten Blutes vor und gleich nach dem Einwirken ultratiefer Kälte bestimmt. Hierbei konnte man fast keine Änderung des Blutzucker- und Blutmilchsäuregehaltes durch Einwirkung ultratiefer Kälte und keine dadurch erfolgte Hämolyse konstatiert werden.

2. Einfluss ultratiefer Kälte auf die Hämoglykolyse.

Nach der Bestimmung von Blutzucker- und Blutmilchsäurespiegel wurde defibriniertes Kaninchenblut auf 2 Kolben verteilt und mit einem Wattepfropf verschlossen. Der eine wurde zur Kontrolle im Eisschrank aufbewahrt. Der andere wurde flüssigem Stickstoff (-196°C) hinreichend ausgesetzt, und dann wurde das Versuchsmaterial bei Zimmertemperatur aufgetaut. Je 2 ccm von diesem mit ultratiefer Kälte behandelten Blut und dem Kontroll-Blut wurden in je 4 mit Stöpseln versehene, kleine Messfläschchen eingebracht, deren Inhalt ca. 3 ccm umfasst. Zur Vermeidung einer Berührung mit Luft wird gewöhnlich flüssiges Paraffin überschichtet. Da sich dieses aber in Form unzähliger Tröpfchen dem Blut beimischt, wenn man letzteres bei der Bestimmung durch Schütteln gleichmässig mischen will, wurden die Fläschchen, nachdem man die Luft in ihnen durch reinen Stickstoff ersetzt hatte, zunächst dicht mit Stöpseln und dann luftdicht mit Paraffin verschlossen. Diese 8 Messfläschchen wurden im Wasserbad bei 38°C stehen gelassen. Nach abgelaufenen 1, 3, 8, und 24 Stunden wurden je 2 von ihnen herausgenommen und Blutzucker und Blutmilchsäure bestimmt. Indem man nach der Bestimmung mit dem übrig gebliebenen Blut Bakterienkulturen auf Fuchsin-Milchzuckeragar nach Endo und auf Blutagar anlegte, prüfte man, ob das Versuchsmaterial ganz steril war, und wenn dieses nicht ganz steril gefunden wurde, wurde das Resultat des entsprechenden Kälteversuches unberücksichtigt gelassen.

Tabelle 1.
Blutglykolyse nach der Behandlung mit ultratiefer Kälte.

Versuchs-Nr.	Körpergewicht (kg) u. Geschlecht	Zeitablauf (Std.)	Kontrolle				Kälteeinwirkung			
			Blutzucker		Milchsäure		Blutzucker		Milchsäure	
			mg/dl	Diff. in %	mg/dl	Diff. in %	mg/dl	Diff. in %	mg/dl	Diff. in %
1	1,85 ♂	vor	99		30,21		99		30,21	
		1	86	-13,13	37,93	+25,55	97	-2,02	30,86	+2,15
		3	68	-31,31	45,69	+51,24	99	0	31,50	+4,27
		8	59	-40,40	52,71	+74,48	97	-2,02	30,86	+2,15
		24	39	-60,60	58,07	+92,22	95	-4,04	31,50	+4,27
2	2,13 ♂	vor	108		34,71		108		34,71	
		1	92	-14,81	39,21	+12,96	108	0	34,07	-1,84
		3	74	-31,48	46,93	+35,20	110	+1,85	35,36	+1,87
		8	56	-48,15	54,00	+55,57	108	0	34,71	0
		24	43	-60,18	62,36	+79,66	110	+1,85	34,07	-1,84
3	1,94 ♂	vor	115		28,93		115		28,93	
		1	95	-17,39	36,64	+26,65	117	+1,74	30,21	+4,42
		3	75	-34,78	44,39	+53,44	115	0	29,57	+2,21
		8	48	-58,26	52,07	+79,99	119	+3,48	30,21	+4,42
		24	29	-74,78	60,43	+108,88	117	+1,74	28,93	0
4	1,80 ♂	vor	88		37,93		88		37,93	
		1	63	-28,41	42,43	+11,86	86	-2,27	38,57	+1,69
		3	41	-53,41	48,21	+27,10	84	-4,54	39,21	+3,37
		8	19	-78,41	55,29	+45,77	86	-2,27	40,50	+6,77
		24	8	-90,91	59,14	+55,92	84	-4,54	39,86	+5,09
5	2,23 ♂	vor	104		35,36		104		35,36	
		1	86	-17,31	41,79	+18,18	104	0	34,71	-1,84
		3	61	-41,35	48,21	+36,34	102	-1,92	34,71	-1,84
		8	39	-62,50	56,57	+59,98	104	0	35,36	0
		24	24	-76,92	66,21	+87,24	104	0	35,36	0
6	1,96 ♂	vor	120		31,50		120		31,50	
		1	86	-28,33	39,86	+26,54	122	+1,67	30,86	-2,03
		3	70	-41,67	47,57	+51,01	124	+3,33	30,86	-2,03
		8	54	-55,00	56,57	+79,59	122	+1,67	30,21	-4,09
		24	48	-60,00	62,36	+97,97	124	+3,33	30,86	-2,03
7	1,60 ♂	vor	93		40,50		93		40,50	
		1	75	-19,35	48,86	+20,64	93	0	41,14	+1,58
		3	56	-39,78	57,21	+41,26	95	+2,15	40,50	0
		8	34	-63,44	65,57	+61,90	95	+2,15	41,14	+1,58
		24	22	-76,34	74,57	+84,12	93	0	41,14	+1,58
8	1,56 ♂	vor	110		30,86		110		30,86	
		1	93	-15,45	35,36	+14,58	108	-1,82	31,50	+2,07
		3	79	-28,18	41,14	+33,31	108	-1,82	32,79	+6,25
		8	57	-48,18	48,21	+56,22	106	-3,64	32,14	+4,15
		24	43	-60,91	53,36	+72,91	104	-5,45	33,43	+8,33
9	1,75 ♂	vor	101		29,57		101		29,57	
		1	81	-19,80	37,29	+26,11	102	+0,99	28,93	-2,16
		3	59	-41,58	46,29	+56,54	106	+4,95	28,93	-2,16
		8	36	-64,36	55,29	+86,98	104	+2,97	28,29	-4,33
		24	17	-83,17	64,92	+119,55	102	+0,99	28,93	-2,16
10	2,06 ♂	vor	124		38,57		124		38,57	
		1	108	-12,90	43,71	+13,33	122	-1,61	37,93	-1,66
		3	102	-17,74	48,86	+26,68	124	0	36,64	-5,00
		8	75	-39,52	54,64	+41,66	120	-3,22	37,29	-3,32
		24	54	-56,45	60,43	+56,68	117	-5,64	36,64	-5,00
Durchschnitt		vor	106		33,81		106		33,81	
		1	89	-16,04	40,31	+19,22	106	0	33,88	+0,24
		3	68	-35,85	47,45	+40,34	107	+0,94	34,01	+0,59
		8	48	-54,72	55,09	+62,94	106	0	34,07	+0,77
		24	33	-68,87	62,18	+83,91	105	-0,94	34,07	+0,77

Da in dem oben erwähnten Versuche festgestellt wurde, dass das Blut gleich nach dem Einwirken einer ultratiefen Kälte von -196°C keine Veränderung seines Blutzucker- und Blutmilchsäurespiegels zeigt, wurden die Werte von Blutzucker und Blutmilchsäure gleich nach der Defibrinierung als Vorwerte bezeichnet. Wie man aus Tab. 1 ersieht, ist die Glykolyse bei dem nicht durch ultratiefe Kälte behandelten Kaninchenblut des Kontrollversuches in den ersten 3 Stunden am deutlichsten, d. h. man beobachtet eine deutliche Abnahme des Blutzuckers und eine deutliche Zunahme der Milchsäure, dann werden die Ab- und Zunahme verhältnismässig langsam, und auch nach Ablauf von 24 Stunden ist der Wert des Blutzuckers noch nicht Null. Bei durch ultratiefe Kälte behandeltem Blut dagegen kann man in manchen Fällen auch eine Abnahme des Blutzuckers und eine Zunahme der Milchsäure nachweisen, aber diese Veränderungen sind ziemlich geringfügig und die Ab- und Zunahme stehen mit dem zeitlichen Ablauf in keiner bestimmten Beziehung. Es gibt auch solche Fälle, wo der Blutzucker in geringem Masse zunimmt und die Milchsäure abnimmt. Kurz, man kann sagen, dass die Hämoglykolyse, wenn Kaninchenblut durch ultratiefe Kälte behandelt wird, vollständig aufhört.

Wenn man den Mechanismus des vollständigen Zessierens der Glykolyse durch ultratiefe Kältewirkung erforschen will, muss man zuerst die Beziehungen zwischen Hämolyse und Glykolyse untersuchen, weil das Blut bei der Kältewirkung vollständig hämolysiert. Edelmann⁷⁾ fand am mit durch Saponin hämolysierten Blut, dass man nur in den ersten 2–3 Stunden eine Hemmung der Glykolyse beobachten konnte und der weitere Verlauf fast gleich dem bei nicht hämolysiertem Blut war. Noshi⁸⁾ stellte fest, dass bei durch Äther hämolysiertem Blut die Glykolyse durch Zusatz von Phosphatgemisch deutlich zustande kam. Era⁹⁾ stellte mit Hühnerblut Versuche an und bestätigte, dass bei normalem Hühnerblut die Glykolyse aufhörte, wenn die Hämolyse eintrat, während bei anämischem Hühnerblut die glykolytische Erscheinung auch festgestellt werden konnte, wenn es hämolysierte. Wenn aber Doyon und Morel¹⁰⁾ mit destilliertem Wasser, Aibara²⁾ mit Saponin oder destilliertem Wasser und Kawashima¹¹⁾ dadurch, dass er Blut durch eine Kältemischung von Eis und Kochsalz wiederholt frieren und auftauen liess, eine vollständige Hämolyse hervorriefen, beobachteten sie alle Abbrechen des glykolytischen Vorgangs. Berücksichtigt man die verschiedenen Umstände, so ist es sehr wahrscheinlich, dass die Glykolyse durch die Hämolyse irgendwie beeinflusst wird. Da aber, wie oben erwähnt, die Meinungen der Autoren dar über nicht vollkommen übereinstimmen, wurden demnächst entsprechende Versuche durchgeführt und zwar bei der Saponinhämolyse, die leicht zu erzeugen ist und bei der Aibara²⁾ Hemmung der Glykolyse

feststellte, während Edelmann⁷⁾ sie vermisste.

3. Glykolyse im mittels Saponins hämolysierten Blute.

Bei 10 ccm defibriniertem Kaninchenblut wurde eine vollständige Hämolysie durch Zugabe von 2 Tropfen einer sterilen 50 %igen Saponinlösung hervorgerufen. Blut ohne Zugabe von Saponin diente zur Kontrolle. Nach dem im vorangehenden Abschnitt dargestellten Verfahren wurde eine zeitliche Bestimmung von Blutzucker und Milchsäure durchgeführt und beobachtet, ob die Glykolyse zustande kam.

Wie Tab. 2 zeigt, ist es eine strikte Tatsache, dass bei der Hämolysie die Glykolyse vollständig zessiert.

Tabelle 2.
Glykolyse im mittels Saponins hämolysierten Blute.

Versuch-Nr.	Körpergewicht (kg) u. Geschlecht	Zeitablauf (Std.)	Kontrolle				Saponinhämolysiertes Blut			
			Blutzucker		Milchsäure		Blutzucker		Milchsäure	
			mg/dl	Diff. in %	mg/dl	Diff. in %	mg/dl	Diff. in %	mg/dl	Diff. in %
1	1,85 ♂	vor	106		33,43		106		33,43	
		1	88	-16,98	42,43	+26,92	104	-1,89	32,79	-1,91
		3	72	-32,07	48,86	+46,16	104	-1,89	34,07	+1,91
		8	43	-59,43	56,57	+69,22	106	0	33,43	0
		24	34	-67,92	63,00	+88,45	104	-1,89	34,07	+1,91
2	1,90 ♂	vor	88		30,86		88		30,86	
		1	70	-25,71	37,29	+20,77	88	0	31,50	+2,07
		3	52	-40,91	43,03	+39,56	90	+2,27	31,50	+2,07
		8	29	-67,04	57,21	+85,38	86	-2,27	30,86	0
		24	12	-86,36	61,71	+99,97	90	+2,27	31,50	+2,07
3	1,75 ♂	vor	95		41,14		95		41,14	
		1	77	-18,95	46,93	+14,07	92	-3,16	40,50	-1,55
		3	59	-37,89	52,71	+28,12	93	-2,10	41,14	0
		8	41	-56,84	57,86	+40,64	90	-5,26	40,50	-1,55
		24	24	-74,74	63,64	+57,69	92	-3,16	39,86	-3,11
4	2,05 ♂	vor	113		27,64		113		27,64	
		1	92	-18,58	35,36	+27,93	111	-1,77	27,00	-2,31
		3	61	-46,02	43,07	+55,82	113	0	27,00	-2,31
		8	39	-65,49	51,43	+86,07	115	+1,77	27,64	0
		24	17	-84,95	58,07	+110,09	115	+1,77	27,64	0
Durchschnitt		vor	100		33,27		100		33,27	
		1	82	-18,00	40,50	+21,73	99	-1,00	32,95	-0,96
		3	61	-39,00	46,93	+41,06	100	0	33,43	+0,48
		8	38	-62,00	55,76	+67,60	99	-1,00	33,11	-0,48
		24	22	-78,00	61,60	+85,15	100	0	33,27	0

Epikrise.

Löwy¹²⁾ beobachtete, dass der Zuckerspiegel, wenn man inaktiviertes Blutserum im Brutofen bei 37°C stehen lässt, eine geringe Abnahme zeigt, auch Stasiak¹³⁾ stellte dieselbe Veränderung fest; beide Autoren führten diese Erscheinung auf eine Bindungsveränderung zwischen Eiweiss und Kohlehydrat oder auf eine kolloidale Zustandsänderung im Serum zurück. Diese Veränderungen sind aber sehr gering und dürfen als mit der Glykolyse

in keiner Beziehung stehend betrachtet werden. Die eigentliche Glykolyse geht nur im Vollblut vor sich und wird nach der bisherigen Meinung der Autoren auf eine fermentative Wirkung zurückgeführt. Darüber aber, auf welchem Bestandteil des Vollblutes der glykolytische Vorgang beruht, gibt es verschiedene Ansichten. Nisian, Hiruma und Fukusima¹⁴⁾ u. a. meinen, dass die Glykolyse auch im Serum oder Plasma vor sich geht. Doyon und Morel¹⁰⁾, Adler¹⁰⁾, Lipschitz¹⁰⁾, Macleod und Wedd¹⁷⁾, Kawashima¹¹⁾, Aibara²⁾ u. a. verneinen diese Ansicht und behaupten, der glykolytische Vorgang sei auf zellige Elemente des Blutes zurückzuführen. Unter den zelligen Elementen, meinen einerseits Azuma¹⁸⁾ und Tuge¹⁹⁾, spielen die Erythrozyten eine wichtige Rolle für die Glykolyse. Andererseits aber behaupten Rona und Arnheim²⁰⁾, Bürger³⁾ u. a., dass nicht nur die roten, sondern auch die weissen Blutzellen eine glykolytische Kraft besitzen. Nach Aibara²⁾ besitzen auch die Leukozyten eine deutliche wahrnehmbare glykolytische Kraft, während den Thrombozyten diese nicht zukommt. Aus dem Gesagten kann man also schliessen, dass die glykolytischen Fermente nicht in den flüssigen Bestandteilen des Blutes, sondern in den Formbestandteilen, insbesondere in den Erythrozyten, welche den grössten Teil der letzteren ausmachen, vorhanden sind.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden bei mit ultratiefer Kälte behandelten Blut neben vollständigem Abbruch der Glykolyse auch das Zustandekommen der Hämolyse konstatiert. Wenn man durch ultratiefe Kälte vollständig hämolysiertes Blut zentrifugierten und den Bodensatz mikroskopierten, fand man weder Erythrozyten, noch eine Spur von Leukozyten. Daraus könnte man schliessen, dass fast alle zelligen Elemente beim Auftauen gefrorenen Blutes zerstört wurden. Auch bei der Saponinhämolyse wurde vollständige Hemmung der Glykolyse beobachtet. Darum ist das Zessieren des glykolytischen Vorgangs durch ultratiefe Kälte höchst wahrscheinlich auf die Zerstörung der Formbestandteile des Blutes zurückzuführen. Da aber unter den Angaben der oben genannten Autoren, welche das Aufhören des glykolytischen Vorgangs der Hämolyse zukommen lassen wollen, noch keine zuverlässige vorliegt, aus welchem Grunde der Zuckerzerfall durch die Hämolyse abgebrochen werde, seien unten darüber einige Betrachtungen angestellt werden.

Das glykolytische Ferment ist es, dessen Wesen noch nicht klar ist und von dem man nicht weiss, ob es wie die anderen üblichen Fermente beschaffen sei. Es wird auch behauptet, dass der glykolytische Vorgang ein an Zellstrukturen gebundener Prozess sei (Lipschitz).¹⁶⁾ In vorliegenden Versuchen wurde das Zessieren der Glykolyse auch konstatiert, wenn die Zellstruktur durch ultratiefe Kälte zerstört worden war; auch bei Saponinhämoly-

se wurde dasselbe Ergebnis erzielt. Berücksichtigt man ferner die Ergebnisse anderer Autoren, die das Verschwinden dieses Prozesses bei verschiedenen hervorgerufenen Hämolysen feststellten, so ist es höchstwahrscheinlich, dass der glykolytische Vorgang bei Zerstörung der Zellen verschwindet. Kawashima¹¹⁾ hat experimentell festgestellt, dass die Glykolyse nicht eintritt, wenn die Blutzellen absterben, obwohl sie nicht zerstört worden sind. Man kann also eine enge Beziehung zwischen der Glykolyse und dem Leben der Zellen feststellen. Was für eine Veränderung wird erwartet, wenn die Zellen sterben? Solange der Organismus lebt, wird es auch durch starke proteolytische Fermente nicht verdaut, während es schnell verdaut wird, sobald er abstirbt. Dieser Unterschied zwischen dem Verhalten der lebenden Zellen und dem der nicht-lebenden scheint nach Fermi²¹⁾, Northrop²²⁾ u. a. auf eine Zustandsänderung der Eiweissmoleküle im Protoplasma zurückzuführen zu sein. Wenn man die Glykolyse als einen fermentativen Vorgang betrachtet, die mit dem Leben der Zellen in einer engen Beziehung steht, so kann man das Verschwinden dieser fermentativen Wirkung auf eine Zustandsänderung der Eiweissmoleküle im Protoplasma der Blutzellen, welche durch den Verlust des Lebens hervorgerufen wird, zurückführen. Aus dem Obengesagten kann man also nichts anders schliessen, als dass das vollständige Zessieren der Glykolyse durch ultratiefe Kälte auf der durch ultratiefe Kälte hervorgerufenen Zustandsänderung der Eiweissmoleküle im Protoplasma der zelligen Blutbestandteile beruht.

Schluss.

1. Wenn man ultratiefe Kälte (flüssigen Stickstoff, Siedepunkt -196°C) auf Blut einwirken lässt, so kommt eine vollständige Hämolyse zustande. Dabei verändert sich der Zucker- und Milchsäurespiegel des Blutes nicht.
2. Im Blut, welches einmal der Einwirkung der ultratiefen Kälte unterzogen worden war, hört der glykolytische Vorgang vollständig auf.

Literatur.

- 1) Kawamura, Nihon Naikagakkai Zassi, 1931, **19**, 1026.
- 2) Aibara, J. Biochem., 1922, **1**, 457.
- 3) Bürger, Ztschr. f. d. ges. exp. Med., 1923, **31**, 1.
- 4) Inawashiro u. Hayasaka, Tohoku J. Exp. Med., 1928, **12**, 1.
- 5) Anrep u. Cannan, J. Physiol., 1923, **58**, 244.
- 6) Hagedorn u. Jensen, Biochem. Ztschr., 1923, **135**, 46.
- 7) Edelmann, Biochem. Ztschr., 1912, **40**, 314.
- 8) Noshi, J. Biochem., 1928, **9**, 243.
- 9) Era, Nagoya Igakkai Zassi, 1936, **44**, 1091.
- 10) Doyon u. Morel, C. R. Soc. Biol. Paris, 1903, **55**, 215.

- 11) Kawashima, J. Biochem., 1922, **2**, 131; 1924, **3**, 273.
 - 12) Löwy, Dtsch. Arch. f. klin. Med., 1916, **120**, 131.
 - 13) Stasiak, Biochem. Ztschr., 1924, **140**, 420.
 - 14) Nisian, Hiruma u. Hukusima, Tokyo Igakkai Zassi, 1921, **35**, 674.
 - 15) Adler, Handbuch d. normalen u. pathologischen Physiologie, Berlin 1928, Bd. 4, 306.
 - 16) Lipschitz, ebenda, Berlin 1927, Bd. 1, 29.
 - 17) Macleod u. Wedd, J. Biol. Chem., 1913, **15**, 497.
 - 18) Azuma, Tyosen Igakkai Zassi, 1935, **25**, 1453.
 - 19) Tuge, Seiikai Zassi, 1937, **56**, 202.
 - 20) Rona u. Arnheim, Biochem. Ztschr., 1913, **48**, 35.
 - 21) Fermi, Zbl. Bakt., Orig. I. Abt., 1910, **56**, 55.
 - 22) Northrop, Crystalline Enzymes, New York 1937, S. 15.
-