

# Über die *meso*-Inosit-Oxygenase aus dem Sproßpilz *Schwanniomyces occidentalis*

Von

Elisabeth Thonet und O. Hoffmann-Ostenhof\*

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 18. November 1965)

Wie bereits früher gefunden wurde<sup>1</sup>, produziert die Hefe *Schwanniomyces occidentalis* auf einem Medium, das *meso*-Inosit als einzige Kohlenstoffquelle enthält, ein Enzym, das *meso*-Inosit unter Ringspaltung zu D-Glucuronsäure umwandelt. In der vorliegenden Arbeit wird über die teilweise Reinigung, die Eigenschaften und die Spezifität dieses Enzyms berichtet. Dieses zeigt weitgehende Übereinstimmung mit der aus Rattenniere isolierbaren *meso*-Inosit-Oxygenase<sup>2</sup> (Systematischer Name *meso*-Inosit : Sauerstoff-Oxydoreductase; EC 1.13.1.11)<sup>3</sup>.

It has been found previously<sup>1</sup> that the yeast *Schwanniomyces occidentalis* when growing on a medium containing *meso*-inositol as the only carbon source produces an enzyme which transforms *meso*-inositol by ring cleavage to D-glucuronic acid. This paper describes the partial purification, the properties, and the specificity of the enzyme, which shows a close resemblance to the *meso*-inositol oxygenase (systematic name *meso*-inositol : oxygen oxidoreductase; EC 1.13.1.11)<sup>3</sup> from rat kidney<sup>2</sup>.

Nach Untersuchungen von *Charalampous*<sup>2</sup> enthält die Rattenniere Enzyme, welche *meso*-Inosit oxydativ aufspalten. Ein solches Enzym, das *meso*-Inosit zu D-Glucuronsäure oxydiert, konnte teilweise gereinigt und als Oxygenase erkannt werden; es handelt sich um die *meso*-Inosit-Oxygenase (systematischer Name: *meso*-Inosit : Sauerstoff-Oxydore-

\* Herrn Prof. Dr. A. Wacek zum 70. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> C. Jungwirth, A. Sivak, O. Hoffmann-Ostenhof und R. G. Janke, Mh. Chem. **92**, 72 (1961); A. Sivak und O. Hoffmann-Ostenhof, Biochem. Z. **336**, 229 (1962).

<sup>2</sup> F. C. Charalampous und C. Lyras, J. Biol. Chem. **228**, 1 (1957); F. C. Charalampous, J. Biol. Chem. **234**, 220 (1958).

<sup>3</sup> Enzyme Nomenclature. Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1965.

ductase; EC 1.13.1.11). Daneben soll die Rattenniere ein weiteres Enzym mit Wirkung auf *meso*-Inosit enthalten, dessen Produkt L-Glucuronsäure sei.

In früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium<sup>1</sup> wurde berichtet, daß der Sproßpilz *Schwanniomyces occidentalis* ein durch *meso*-Inosit induzierbares Enzym produziert, welches *meso*-Inosit anscheinend in gleicher Weise abbaut wie die *meso*-Inosit-Oxygenase aus Rattennieren. Damit unterscheidet sich diese Hefe-Art von allen bisher auf Enzyme des *meso*-Inosit-Stoffwechsels untersuchten Mikroorganismen, wo man durchwegs Dehydrogenasen findet, die *meso*-Inosit unter Aufrechterhaltung der Ringstruktur zu entsprechenden Mono- und Diketoverbindungen oxydieren.

Es erschien uns von Interesse, das *meso*-Inosit oxydierende Enzym aus *S. occidentalis* näher zu untersuchen und mit der *meso*-Inosit-Oxygenase aus Rattenniere zu vergleichen. Es ergab sich dabei tatsächlich eine weitgehende Übereinstimmung der beiden Enzyme. Der Sproßpilz enthält kein Enzym, das *meso*-Inosit zu L-Glucuronsäure abbaut; allerdings fanden wir auch bei der Einwirkung von Rohextrakten aus Rattenniere, welche nach *Charalampous*<sup>2</sup> beide Enzyme enthalten sollten und zumindest teilweise racemische Glucuronsäure bilden sollten, immer nur Oxydation von *meso*-Inosit zu D-Glucuronsäure.

### Materialien und Methoden

*Substrate und Vergleichssubstanzen.* Von den eingesetzten Substraten wurde *meso*-Inosit als Handelsprodukt bezogen, während Scyllit aus der Pflanze *Calycanthus occidentalis* isoliert wurde. L- und D-Inosit wurden durch Entmethylierung von L-Quebrachit bzw. D-Pinit hergestellt; *meso*-Inosose-2 (2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon) und ( $\pm$ )-*epi,meso*-Inosose (DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon) wurden durch verschieden gelenkte Oxydation von *meso*-Inosit<sup>4</sup>, *meso*-Inosose-1 (L-2,3,5/4,6-Pentahydroxycyclohexanon) durch katalytische Luftoxydation aus L-Inosit gewonnen<sup>5</sup>. Von den Vergleichssubstanzen waren D-Glucuronsäure, D-Glucuronolacton und D-Galakturonsäure kommerzielle Produkte. L-Glucuronsäure wurde hingegen aus L-Glucose<sup>6</sup> über 1,2,3,4-Tetraacetyl- $\beta$ -L-glucose, welche mit KMnO<sub>4</sub> oxydiert wurde, hergestellt.

*Bestimmung der Enzymaktivität.* Das Reaktionsgemisch (gewöhnlich 2 ml Enzymlösung, 2 ml 0,1*m*-*meso*-Inosit-Lösung, 1 ml 0,1*m*-Phosphatpufferlösung, pH 7,2) wurde bei 30° 20 Min. unter Durchleiten von Sauerstoff inkubiert, das Enzym darauf durch 10 Min. Kochen inaktiviert und die entstandene Glucuronsäure schließlich mit Hilfe der Orcin-Methode von *Mejbaum*<sup>7</sup> in der Modifikation von *Charalampous*<sup>2</sup> bestimmt.

<sup>4</sup> T. Posternak, Biochem. Prep. **2**, 57 (1952).

<sup>5</sup> L. Anderson und K. Post, Abstr. 134th Meeting Amer. Chem. Soc., S. 12D (1958).

<sup>6</sup> J. C. Sowden und H. O. L. Fischer, J. Amer. Chem. Soc. **69**, 1963 (1947).

<sup>7</sup> W. Mejbaum, Z. physiol. Chem. **258**, 117 (1939).

*Bestimmung der Proteinkonzentration der Enzympräparationen.* Die Konzentration der Proteine wurde nach Warburg und Christian<sup>8</sup> gemessen.

*Züchtung des Organismus.* Die Züchtung des verwendeten Stammes von *Schwanniomycetes occidentalis*, der aus der Sammlung des Instituts für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule Wien stammt, wurde bereits an anderer Stelle<sup>9</sup> beschrieben.

## Ergebnisse

*Herstellung der enzymatisch aktiven Rohextrakte und Anreicherung des Enzyms.* Da sich das Enzym durch besonders große Empfindlichkeit gegenüber Spuren von Schwermetallen auszeichnet, wurde dem für die einzelnen Reinigungsschritte verwendeten dest. Wasser jeweils 50 mg Komplexon (Äthylendiamintetraessigsäure) pro 1000 ml zugesetzt. Sämtliche Reinigungsoperationen erfolgten bei wenig über 0°.

Aus den nach 4 Tagen Wachstum geernteten und abzentrifugierten Zellen von *S. occidentalis* wurde mit 0,1*M*-Phosphatpuffer, pH 7,2, eine 40proz. Suspension hergestellt und diese 3 Min. unter Kühlung mit Trockeneis im Zellhomogenisator nach Merckenschlager und Mitarb.<sup>10</sup> behandelt. Darauf trennte man die Zellreste durch Zentrifugieren (100 000 × g, 30 Min.) ab; die klare überstehende Lösung wurde dann gegen dest. Wasser 2 Stdn. dialysiert (Stufe **a**).

Die so erhaltene Lösung wurde mit Phosphatpuffer auf pH 7,2 eingestellt und dann mit Clupeinsulfat bis zu einer Endkonzentration von 0,1% versetzt. Nach 10 Min. wurde der Niederschlag abzentrifugiert; die überstehende Lösung (Stufe **b**) wurde weiterverarbeitet.

Man versetzte Stufe **b** bei 0° mit festem Ammoniumsulfat, bis 40% Sättigung erreicht war, und stellte dann mit 3*n*-NH<sub>3</sub> auf pH 7,2. Nach 15 Min. wurde der Niederschlag abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und schließlich 2 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert (Stufe **c**). Je 100 ml der so erhaltenen Lösung wurden mit 5 ml Calciumphosphatgel (10 mg Calciumphosphat pro ml Wasser) 10 Min. verrührt und dann das Calciumphosphat durch Zentrifugieren entfernt (Stufe **d**). Zu Stufe **d** wurde eine Aufschlammung von DEAE-Cellulose (10 ml Aufschlammung auf 100 ml überstehende Lösung der Stufe **d**) unter Rühren hinzuge tropft und die Mischung 10 Min. stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren der DEAE-Cellulose erhielt man Reinigungsstufe **e**.

Der Erfolg dieser Reinigungsoperationen ist in Tab. 1 dargestellt.

Das zu Vergleichszwecken notwendige Enzym aus Rattenniere wurde genau nach den Angaben von Charalampous<sup>2</sup> hergestellt.

*Isolierung und Identifizierung des Produktes.* Aus dem Reaktionsgemisch wurde durch Kochen das Protein ausgeflockt und abzentrifugiert. Man brachte die Lösung dann auf eine Austauschersäule (20 × 1 cm), die mit Dowex 1 × 8 (OH<sup>-</sup>-Form) gefüllt war, auf. Nach Nachwaschen

<sup>8</sup> O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. **310**, 384 (1942).

<sup>9</sup> P. Dworsky und O. Hoffmann-Ostenhof, Acta biochim. Polon. **11**, 269 (1964).

<sup>10</sup> M. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, Biochem. Z. **329**, 332 (1957).

mit 10 ml dest. Wasser wurde mit 2*n*-HCl eluiert. Die uronsäurehaltigen Fraktionen wurden papierchromatographisch weiter gereinigt, wobei als Laufmittel das Gemisch Äthanol—Essigsäure—Wasser 8:1:1 zur Verwendung kam. Wie bereits in unserer früheren Mitteilung<sup>1</sup> berichtet, gibt das Reaktionsprodukt alle Reaktionen, die für Glucuronsäure spezifisch sind. Um die Stereospezifität des Enzyms zu untersuchen, setzten wir *meso*-Inosit-(*G*)-<sup>14</sup>C als Substrat ein. Das Produkt der Reaktion wurde gereinigt und mit Träger-D-Glucuronsäure viermal umkristallisiert, wobei die Radioaktivität konstant blieb.

Tabelle 1. Anreicherung der *meso*-Inosit-Oxygenase aus *S. occidentalis*

Reinigungsstufe	Volumen ml	Gesamtaktivität. Internat. Einheiten ( <i>U</i> ) <sup>2</sup>	Spezif. Aktivität <i>U</i> pro mg Protein
<b>a</b>	50	$5,7 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-2}$
<b>b</b>	42	$5,8 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-2}$
<b>c</b>	17	$5,2 \times 10^{-1}$	$7,7 \times 10^{-2}$
<b>d</b>	16	$4,8 \times 10^{-1}$	$3,5 \times 10^{-1}$
<b>e</b>	17	$4,3 \times 10^{-1}$	$8,8 \times 10^{-1}$

Die Bestimmung der Stereospezifität war auch im Falle der Rohextrakte aus Rattennieren von besonderer Bedeutung, da diese sowohl das Enzym, welches D-Glucuronsäure produziert, als auch jenes, dem die Fähigkeit zur Bildung von L-Glucuronsäure zugeschrieben wird, enthalten sollen<sup>2</sup>. Wir bedienten uns deshalb zweier weiterer Methoden. Messung der optischen Drehung ergab stets einen Wert, der dem theoretischen Wert für D-Glucuronsäure entspricht. Weiters inkubierten wir *Escherichia coli* mit dem gereinigten Reaktionsprodukt aus *meso*-Inosit-(*G*)-<sup>14</sup>C. Nach 3 Tagen war nach einem rapiden Konzentrationsabfall keinerlei markierte Glucuronsäure mehr nachweisbar. Wenn ein Racemat vorhanden gewesen wäre, so wäre die Aktivität auf einen bestimmten Wert abgesunken und dann konstant geblieben. Wir konnten in entsprechenden Kontrollversuchen mit L-Glucuronsäure zeigen, daß diese von *E. coli* nicht angegriffen wird. Die Ergebnisse lassen jedenfalls keinen Zweifel darüber offen, daß sowohl das Enzym aus *S. occidentalis* als auch unsere Rohextrakte aus Rattennieren *meso*-Inosit in einer solchen Weise oxydieren, daß D-Glucuronsäure als einziges Produkt entsteht.

*Stabilität des Enzyms.* Das Enzym aus *S. occidentalis* ist an der Luft — ebenso wie die *meso*-Inosit-Oxygenase aus Rattenniere — sehr instabil. Bei 0° sinkt die Aktivität jeder Reinigungsstufe innerhalb von 12 Stdn. auf die Hälfte. Bei Aufbewahrung von Reinigungsstufe **d** bei —10° unter N<sub>2</sub> ist der Aktivitätsverlust wesentlich geringer; nach 2 Tagen blieben noch 95% der Aktivität erhalten.

*pH-Optimum der Enzymwirkung.* Das Enzym aus *S. occidentalis* zeigt in 0,1*m*-Phosphatpufferlösung ein deutliches und relatives scharfes pH-Optimum seiner Wirkung bei 7,2. Bei pH 6,8 werden 70%, bei pH 7,5 55% der Optimalaktivität gemessen.

*Michaelis-Konstante.* Bei der Ermittlung der *Michaelis*-Konstante des Enzyms aus *S. occidentalis* für das Substrat *meso*-Inosit wurde nach *Lineweaver* und *Burk*<sup>11</sup> vorgegangen. Es wurde der Wert von  $4,5 \times 10^{-2}$  Mol/l gefunden.

*Stöchiometrie der Reaktion.* Die Annahme, daß das Enzym aus *S. occidentalis* ebenso wie das analoge Enzym aus Rattennieren eine *meso*-Inosit-Oxygenase ist, wurde durch Messung der Sauerstoffaufnahme während der Reaktion geprüft. Zu diesem Zweck bedienten wir uns der manometrischen Methode und verfolgten in einem Parallelversuch die Bildung von Glucuronsäure mit Hilfe der Orcinreaktion. Es wurde gute Übereinstimmung der gemessenen Werte beobachtet.

*Substratspezifität.* Es wurden Versuche über die Fähigkeit des Enzyms aus *S. occidentalis*, außer *meso*-Inosit auch andere Cyclite anzugreifen, mit den uns zur Verfügung stehenden Substraten unternommen. Die Ergebnisse dieser Experimente finden sich in Tab. 2.

Tabelle 2. Substratspezifität der *meso*-Inosit-Oxygenase aus *S. occidentalis*

Substrat	Aktivität in Prozenten derjenigen gegenüber <i>meso</i> -Inosit
D-Inosit	92
L-Inosit	100
Scyllit	78
<i>meso</i> -Inosose-1	100
<i>meso</i> -Inosose-2	0
<i>epi,meso</i> -Inosose	0
L-Quebrachit	0
D-Pinit	0

Im Falle des L-Inosits und des D-Inosits wurde außerdem versucht, die Reaktionsprodukte zu identifizieren. Durch papierchromatographische Vergleiche mit Testsubstanzen konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß L-Inosit ebenso wie *meso*-Inosit zu D-Glucuronsäure oxydiert wird, während das Produkt aus D-Inosit D-Galacturonsäure ist. Die geringen Mengen an Substraten machten es unmöglich, die aus Scyllit und *meso*-Inosose-1 entstehenden Substanzen zu bestimmen.

Die Fähigkeit unseres Enzyms aus *S. occidentalis*, *meso*-Inosose-1 zu oxydieren, veranlaßte uns zu einer Nachprüfung der Angabe von *Chara-*

<sup>11</sup> H. *Lineweaver* und D. *Burk*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).

*lampous*<sup>2</sup>, daß das Enzym aus Rattenniere dieses Substrat nicht angreift. Im Gegensatz zum genannten Autor fanden wir mit einem gereinigten Präparat von *meso*-Inosit-Oxygenase aus Rattenniere eine sehr deutliche Oxydation von *meso*-Inosose-1 zu einer orcinpositiven Substanz.

*Einwirkung von Inhibitoren.* Der Effekt verschiedener Inhibitoren, von denen wir durchwegs annehmen müssen, daß sie mit einem im Enzymmolekül als Teil der aktiven Gruppierung vorhandenen Eisenatom reagieren, ist in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3. Wirkung von Inhibitoren auf die Aktivität der *meso*-Inosit-Oxygenase aus *S. occidentalis* auf *meso*-Inosit

Inhibitor	mol. Konzentration	Hemmung in Proz.
Kaliumcyanid	$3,5 \times 10^{-3}$	41
	$5 \times 10^{-4}$	10
8-Hydroxychinolin	$1 \times 10^{-3}$	84
	$1 \times 10^{-4}$	49
	$1 \times 10^{-5}$	12
Hydroxylamin	$1 \times 10^{-4}$	47
	$5 \times 10^{-5}$	13
Phenanthrolin	$1 \times 10^{-3}$	33
	$1 \times 10^{-4}$	17
$\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl	$1 \times 10^{-3}$	48
	$1 \times 10^{-4}$	27
	$1 \times 10^{-5}$	12

### Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit berichteten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das durch *meso*-Inosit im Nährboden des Organismus induzierbare *meso*-Inosit oxydierende Enzym aus *S. occidentalis* eine Oxygenase ist, welche mit der seinerzeit von *Charalampous*<sup>2</sup> aus Rattenniere isolierten *meso*-Inosit-Oxygenase sehr nahe verwandt ist. Den beobachteten Übereinstimmungen entsprechend ist das Enzym aus *S. occidentalis* nach den Regeln der Enzymnomenklatur<sup>3</sup> ebenso wie das Enzym aus Rattennieren zu benennen. Es erhält somit die Systemnummer 1.13.1.11, den systematischen Namen *meso*-Inosit : Sauerstoff-Oxydoreductase und die Kurzbezeichnung *meso*-Inosit-Oxygenase.

Einige Unterschiede der Eigenschaften unseres Enzyms aus *S. occidentalis* und derjenigen des Enzyms aus Rattenniere, wie es von *Charalampous*<sup>2</sup> beschrieben wurde, veranlaßten uns, auch dieses Enzym in den Bereich der Untersuchungen einzubeziehen. Es gelang uns allerdings nicht, diejenigen Eigenschaften des Rattennieren-Enzyms, welche die

wesentlichsten Unterschiede der beiden Enzyme bedingen sollten, zu verifizieren.

So ist nach *Charalampous*<sup>2</sup> das Enzym aus Rattennieren im Rohextrakt und auch in den ersten Reinigungsstufen von einem zweiten Enzym begleitet, das sich von der *meso*-Inosit-Oxygenase dadurch unterscheidet, daß es *meso*-Inosit nicht zu D-Glucuronsäure, sondern zu deren Enantiomeren, der L-Glucuronsäure oxydiert. Beim Enzym aus *S. occidentalis* wird bereits im Rohextrakt *meso*-Inosit ausschließlich zu D-Glucuronsäure oxydiert. Bei der Nachuntersuchung der Befunde von *Charalampous* am Enzym aus Rattenniere konnten wir weder bei Untersuchung von Rohextrakten noch bei höheren Reinigungsstufen einen Hinweis auf die Existenz eines zweiten *meso*-Inosit oxydierenden Enzyms finden. Das aus *meso*-Inosit entstehende Produkt war immer D-Glucuronsäure, was mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden eindeutig nachgewiesen wurde. Es soll hier daran erinnert werden, daß bereits *Burns* und Mitarb.<sup>12</sup> die Existenz eines L-Glucuronsäure bildenden Enzyms in der Rattenniere angezweifelt hatten.

Ein zweiter auffallender Unterschied wäre die nach *Charalampous*<sup>2</sup> wesentlich strengere Substratspezifität des Enzyms aus Rattenniere, das außer *meso*-Inosit nur D-Inosit angreifen soll, während das Enzym aus *S. occidentalis* auch L-Inosit, Scyllit und *meso*-Inosose-1 zu orcinpositiven Substanzen oxydiert. Wir haben nicht alle genannten Substrate am Rattennieren-Enzym überprüft; wir konnten aber im Falle von *meso*-Inosose-1 — entgegen den ausdrücklichen Angaben des amerikanischen Autors — feststellen, daß diese Substanz von beiden Enzymen mit etwa gleicher Geschwindigkeit oxydiert wird.

Leider standen uns nicht ausreichende Mengen des zuletzt genannten Substrats zur Verfügung, so daß wir nicht die attraktive Hypothese, daß *meso*-Inosose-1 ein Zwischenprodukt des Abbaus von *meso*-Inosit zu D-Glucuronsäure darstellt, prüfen konnten. Untersuchungen in dieser Richtung und weitere Prüfung der Substratspezifität beider Enzyme sind geplant.

Aus den hier berichteten Ergebnissen geht wohl eindeutig die weitgehende Übereinstimmung der beiden Enzyme hervor, wobei noch auf die gleichartige Empfindlichkeit gegenüber Metallionen und anderen denaturierenden Einflüssen sowie auf die Ähnlichkeit des Verhaltens gegenüber Inhibitoren hingewiesen werden soll. In diesem Zusammenhang ist vielleicht noch zu erwähnen, daß die von *Charalampous*<sup>2</sup> ausgearbeiteten Verfahren zur Konzentrierung des Enzyms aus Rattenniere fast ohne jede Modifikation auch für das Enzym aus *S. occidentalis* verwendet

<sup>12</sup> J. J. Burns, N. Trousof, C. Evans, N. Papadopoulos und B. W. Agranoff, Biochim. biophys. Acta **32**, 1608 (1959).

werden können. Wenn dies auch keinen zwingenden Schluß zuläßt, so deutet es doch auf eine weitgehende Ähnlichkeit der Enzymproteine.

Es muß jedenfalls als bemerkenswert angesehen werden, daß Enzyme aus derart verschiedenen Ausgangsmaterialien — tierisches Gewebe und ein Sproßpilz — so weitgehend in ihren Eigenschaften übereinstimmen. Es ist aber nicht nur die Ähnlichkeit der Enzyme des ersten Angriffs, welche auffällt; in früheren Mitteilungen aus diesem Laboratorium<sup>1, 9, 13</sup> haben wir bereits darauf hingewiesen, daß der gesamte Abbauweg des *meso*-Inosits in *S. occidentalis* völlig den entsprechenden Vorgängen im Säugetier entspricht. Alle sonstigen, bisher auf ihre Fähigkeit *meso*-Inosit abzubauen untersuchten Mikroorganismen hingegen greifen *meso*-Inosit primär durch Oxydation der Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 2 an, wobei *meso*-Inosose-2 entsteht. Es scheint sich hier um eine ausgesprochene Sonderstellung der Sproßpilze gegenüber den anderen Mikroorganismen zu handeln.

Herrn Dr. *H. Kindl* und Herrn Dr. *P. Dworsky* danken wir für hilfreiche Diskussion und methodische Ratschläge, Herrn *G. J. Kremlicka* für die freundliche Überlassung einiger von ihm hergestellter Substrate. Die vorliegende Arbeit wurde durch Förderungsbeiträge der Ludwig Boltzmann-Gesellschaft, Wien, sowie der Sektion IV (Verstaatlichte Betriebe) des Bundeskanzleramts der Republik Österreich in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.

---

<sup>13</sup> *P. Dworsky* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, *Biochem. Z.* **343**, 394 (1964).