

# Abbau von Antipyrin durch Pyrazon-abbauende Bakterien

Degradation of Antipyrin by Pyrazon-Degrading Bacteria

K. Sauber, R. Müller, E. Keller, J. Eberspächer und F. Lingens

Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim

(Z. Naturforsch. 32 c, 557–562 [1977]; eingegangen am 23. März 1977)

Degradation of Aromatic Compounds, Degradation of Antipyrin, Antipyrin Metabolites, Degradative Enzymes, Degradative Pathway

Bacteria with the ability to grow on pyrazon as sole source of carbon were isolated from soil. They also are able to grow on antipyrin. Then three metabolites of antipyrin can be isolated from the culture fluid which were identified as 2,3-dimethyl-1-(*cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4,6-cyclohexadiene-1-yl)-pyrazolone (5) (**I**), as 2,3-dimethyl-1-(2,3-dihydroxyphenyl)-pyrazolone (5) (**II**) and as 2,3-dimethyl-pyrazolone (5) (**III**), respectively. Compound **I** and **II** were used as substrates for enzyme studies. A dioxygenase catalyzes the enzymatic conversion of antipyrin into compound **I**. In the presence of NAD as cosubstrate compound **I** is transformed into compound **II** by a dehydrogenase. A pure preparation of metapyrocatechase from pyrazon-degrading bacteria converts compound **II** into the dephenylated heterocyclic moiety of antipyrin (**III**) and into 2-pyrone-6-carboxylic acid. Based on the results of the enzymatic studies a pathway for the degradation of antipyrin is proposed.

Antipyrin wurde bereits vor der Jahrhundertwende als fiebersenkendes und schmerzlinderndes Medikament in die Therapie eingeführt und gehört auch heute noch zu den wichtigsten Analgetika. Über den Metabolismus von Antipyrin im Versuchstier und im Menschen liegen bereits seit längerer Zeit Untersuchungsergebnisse vor<sup>1,2</sup>. Untersuchungen zum Metabolismus von Antipyrin in Bakterien sind der Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Bei unseren Studien zum Abbau von Pyrazon, der Wirksubstanz des rübenselektiven Herbizids Pyramin®, konnten wir aus Erdproben von verschiedenen Stellen der Welt Bakterien isolieren, die mit Pyrazon als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen<sup>3</sup>. Die Mehrzahl dieser Bakterienstämme ist auch in der Lage, Antipyrin als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Über chemische und enzymatische Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Antipyrin wird im folgenden berichtet.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Lingens, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70.

**Abkürzungen:** Antipyrin, 2,3-Dimethyl-1-phenyl-pyrazolone (5); Pyrazon, 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3 (2H)-pyridazinon; **I**, 2,3-Dimethyl-1-(*cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4,6-cyclohexadien-1-yl)-pyrazolone (5); **II**, 2,3-Dimethyl-1-(2,3-dihydroxyphenyl)-pyrazolone (5); **III**, 2,3-Dimethyl-pyrazolone (5); Dioxygenase, 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3 (2H)-pyridazinon-dioxygenase; Dehydrogenase, 5-Amino-4-chlor-2-(2,3-cis-dihydro-2,3-dihydroxycyclohexa-4,6-dien-1-yl)-3 (2H)-pyridazino-NAD-oxidoreductase; Metapyrocatechase, Brenzkatechin-O<sub>2</sub>-2,3-oxidoreductase

## Material und Methoden

### Geräte

UV-Spektren wurden mit einem Zeiss-Spektrographen DMR 21 aufgenommen. IR-Spektren wurden mit einem Leitz-Spektrographen in KBr mit einer Mikroeinrichtung gemessen. Massenspektren wurden mit einem Varian MAT 311 aufgenommen. Zur Messung des CD-Spektrums diente ein Gerät von Cary. Das NMR-Spektrum wurde mit einem 90 MHz Gerät von Bruker aufgenommen. Zur Züchtung größerer Zellmengen diente ein 100-l-Fermentor von Marubishi.

### Chemikalien

Antipyrin stammte von Riedel de Haen. 2,3-Dimethylpyrazolone (5) (**III**) wurde synthetisiert<sup>4</sup>.

Sephadex LH 20 wurde von Pharmacia, alle übrigen Chemikalien wurden von Merck bezogen.

### Bakterienstämme

Es wurden die Stämme E und L der von Fröhner et al.<sup>3</sup> isolierten Pyrazon-abbauenden Bakterien verwendet.

### Züchtungsbedingungen

Die Zusammensetzung des Antipyrin-Mineralsalzmediums und die Prozedur zur Züchtung größerer Zellmengen wurde an anderer Stelle beschrieben<sup>5</sup>. Zur Gewinnung der Antipyrinmetaboliten I und II wurden die Bakterien in 2 l-Erlenmeyerkolben oder im 10 l-Fermentor kultiviert.

### Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtplatten wurden mit Kieselgel HF<sub>254</sub> (Merck) beschichtet. Es wurden zwei Laufmittelsysteme verwendet: Laufmittel I: Benzol/Äthanol/



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Aceton (9 : 2 : 1); Laufmittel II: Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 2 : 1). Die Substanzflecken wurden unter UV-Licht lokalisiert.

#### *Isolierung und Reinigung der Antipyrinmetaboliten*

Beim Wachstum der Pyrazon-abbauenden Bakterien vom Stamm L in Antipyrin-Mineralsalzmedium wurde in eintägigen Abständen ca. 1 ml Medium steril entnommen. Das Medium wurde dünnsschicht-chromatographisch untersucht (Laufmittel I). Wenn die Konzentration der Antipyrinmetaboliten I bzw. II einen optimalen Wert erreicht hatte, wurde die Fermentation beendet, und die Zellen wurden aus dem Medium durch Zentrifugation entfernt. Der pH-Wert des Mediums wurde durch Zusatz von 1 N NaOH auf 7,0 gebracht. Danach wurde das Medium am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Äthanol ausgekocht. Nach dem Abkühlen wurde abfiltriert und das Filtrat mit demselben Volumen an Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde auf eine Säule ( $5 \times 100$  cm) mit Sephadex LH 20 aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Äthanol/Wasser (1 : 1) eluiert. Diejenigen Fraktionen, die überwiegend I bzw. II bzw. III enthielten, wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die weitere Reinigung von I bzw. II erfolgte durch Chromatographie an einer Säule ( $2,5 \times 40$  cm) mit Kieselgel Typ 60. Die Elution erfolgte mit Essigester/Äthanol (70 : 30). I wurde schließlich aus Methylchlorid/Cyclohexan umkristallisiert. Die Reinigung von III gelang durch Umkristallisieren der von der Sephadex LH 20 Säule eluierten und eingeengten Fraktionen zuerst aus Wasser und anschließend aus Äthanol.

#### *Enzymtests*

##### a) Dioxygenase

Über Testansatz und Testbedingungen wurde an anderer Stelle berichtet<sup>5</sup>.

##### b) Dehydrogenase

In einem Gesamtvolume von 0,5 ml wurden gemischt: 0,5  $\mu\text{M}$  NAD<sup>+</sup>, 0,1 bis 0,5  $\mu\text{M}$  I, Enzym und 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 bzw. 0,4 M Glycin/NaOH Puffer pH 9,5. Inkubiert wurde 5 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 0,5 N HCl gestoppt. Das enzymatisch gebildete Brenzkatechinderivat wurde mit dem Nitrit-Molybdatreagens<sup>6</sup> nachgewiesen. Die Extinktion des roten Farbstoffs wurde bei 512 nm gemessen. In einer zweiten Testmodifikation wurde in der Küvette der Anstieg des enzymatisch gebildeten NADH bei 340 nm registriert.

##### c) Metapyrocatechase

Der Test wurde in derselben Art durchgeführt wie bereits beschrieben<sup>7</sup>.

## Ergebnisse

#### *Auftreten der Antipyrinmetaboliten bei der Fermentation*

Der Stamm L der Pyrazon-abbauenden Bakterien wurde in einem Antipyrin-Mineralsalzmedium (mit 1,5 g Antipyrin pro l) gezüchtet. Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen dünnsschichtchromatographisch untersucht.

Nach zweiwäigem Wachstum erreichte die Konzentration an Metabolit I ihren höchsten Wert und nahm im Verlauf der folgenden Tage nur unwesentlich ab. Die Konzentration an Metabolit II erreichte nach 3- bis 4wäigem Wachstum ihr Maximum und sank anschließend wieder ab. Die Konzentration an Metabolit III nahm im Verlauf des Wachstums stetig zu.

#### *Strukturaufklärung der Antipyrinmetaboliten*

##### a) Verbindung I

Nach dem Umkristallisieren aus Methylchlorid/Cyclohexan fällt I in Form weißer Nadeln vom Schmelzpunkt 136 °C an. Mit dem Perjodat-Benzidin-Reagens reagiert I positiv, was für das Vorhandensein einer  $\alpha$ -Diol-Gruppe spricht. Durch dünnsschichtchromatographische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in 0,5 N HCl aus I zwei neue Verbindungen entstehen, die nicht mehr Perjodat-aktiv sind. Mit 2,6-Dichlorchinon-chlorimid, einem Reagens auf Phenole, werden die beiden Substanzen schwach hellbau gefärbt. I geht also in saurer Lösung in der für *ortho*-Dihydrodihydroxy-Verbindungen charakteristischen Weise in die beiden entsprechenden Phenole, das *ortho*- und *meta*-Phenol des Antipyrins über (*ortho*-Phenol = 2,3-Dimethyl-1-(2-hydroxyphenyl)-pyrazolon (5) und *meta*-Phenol = 2,3-Dimethyl-1-(3-hydroxyphenyl)-pyrazolon (5)).

In Übereinstimmung mit der Existenz von zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen ist Verbindung I optisch aktiv. Das CD-Spektrum zeigt einen negativen Cotton-Effekt ( $\lambda_{\max} = 275$  nm) und einen schwächeren negativen Cotton-Effekt ( $\lambda_{\max} = 228$  nm). Im Massenspektrum von I tritt der Molekülpunkt mit einer relativen Intensität von 23% bei  $m/e = 222$  auf. Wesentlich intensiver (70%) ist der M-H<sub>2</sub>O Peak bei  $m/e = 204$ . Bei  $m/e = 205$  tritt mit 64% relativ Intensität der M-OH Peak auf. Bei  $m/e = 175$  erscheint mit 25% relativ Intensität ein Peak, der durch Abspaltung eines CHO-Fragments aus dem Antipyrinphenol zu deuten ist. Der 100% Peak erscheint bei  $m/e = 98$ .

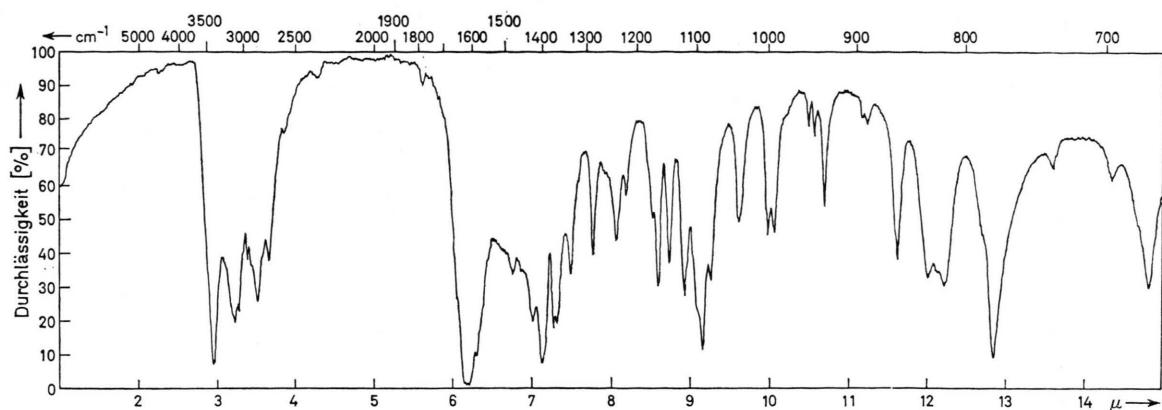


Abb. 1. Infrarot-Spektrum von Verbindung I.

Eine wäßrige Lösung von I zeigt im UV-Spektrum ein Maximum bei 255 nm.

Der Zusatz von Alkali verändert das UV-Spektrum nur unwesentlich, dagegen bewirkt der Zusatz von Säure (auf pH 1) wegen des Zerfalls von I in saurer Lösung zu den beiden entsprechenden Phenolen eine starke Veränderung des UV-Spektrums. Es treten zwei neue Maxima bei 264 und 236 nm auf. In Abb. 1 ist das IR-Spektrum von I dargestellt.

### b) Verbindung II

Dieser Metabolit konnte in Form weißer Kristalle vom Schmelzpunkt 207 °C erhalten werden.

Mit dem Nitrit-Molybdat-Reagens auf Brenzkatechine und mit dem FeCl<sub>3</sub>-Reagens auf Phenole reagiert II positiv.

Im Massenspektrum von II ist in Übereinstimmung mit der aromatischen Struktur das Molekülion bei  $m/e = 220$  der intensivste Peak. Mit geringen

Intensitäten sind noch folgende Peaks zu beobachten:

Mit 17% relativer Intensität das durch CHO-Abspaltung entstehende Fragment bei  $m/e = 191$  und außerdem Peaks bei  $m/e = 177$  (28%), bei  $m/e = 163$  (21%) und bei  $m/e = 112$  mit 14% relativer Intensität der Antipyrin-Heterocyclus. Das UV-Spektrum einer wäßrigen Lösung von Verbindung II zeigt bei 251 nm ein Maximum. Bei Zusatz von Alkali (auf pH 13) ist eine starke Phenolatverschiebung zu beobachten. Bei 307 nm tritt ein neues Maximum mit Schulter bei 317 nm auf, ein zweites Maximum erscheint bei 245 nm. Abb. 2 zeigt das IR-Spektrum von II.

### c) Verbindung III

Diese Verbindung wurde in Form weißer Kristalle vom Schmelzpunkt 174 °C erhalten. Synthetisch gewonnenes 2,3-Dimethylpyrazolon (5) zeigte denselben Schmelzpunkt. Der Mischschmelzpunkt

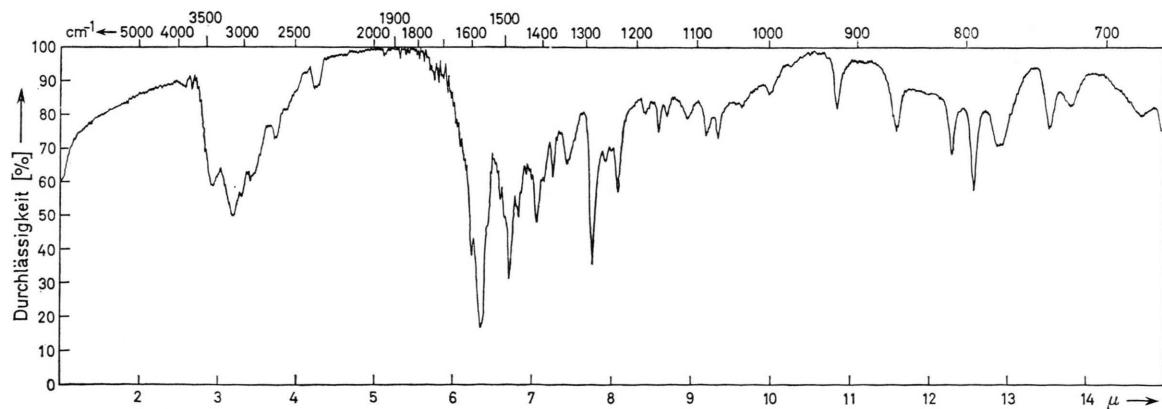


Abb. 2. Infrarot-Spektrum von Verbindung II.

zeigte keine Depression. Synthetisches und isoliertes Produkt waren ebenfalls in ihrem dünnenschichtchromatographischen Verhalten ununterscheidbar. Auch das UV-Spektrum, das IR-Spektrum und das Massenspektrum von Metabolit III und von synthetisiertem 2,3-Dimethylpyrazolon (5) waren identisch.

#### Enzymatische Versuche

##### a) Dioxygenase

Im zellfreien Extrakt von Pyrazon-abbauenden Bakterien lässt sich die enzymatische Umsetzung von Antipyrin zu I nachweisen. Mit NADH als Cosubstrat und unter Verbrauch von  $O_2$  wird Antipyrin am Phenylring zur entsprechenden *ortho*-Dihydrodihydroxy-Verbindung oxidiert. Diese Reaktion wird von der Pyrazondioxygenase katalysiert, einem Enzymkomplex, der aus drei verschiedenen Proteinkomponenten besteht. Über die Reinigung und die Eigenschaften der Pyrazondioxygenase wird an anderer Stelle berichtet<sup>5</sup>. Die drei Komponenten können durch chromatographische Verfahren voneinander getrennt und gereinigt werden. Mit spektroskopischen Methoden wurden die Komponenten hinsichtlich ihrer Eigenschaften und ihrer Funktion näher charakterisiert. Demnach besteht die Pyrazondioxygenase aus einem Flavoprotein, das als Reduktase fungiert, weiter aus einem Eisen-Schwefel-Protein mit der Funktion eines Elektronenüberträgers und einem weiteren Eisen-Schwefel-Protein, welches die Umwandlung von Substrat und Sauerstoff zum Produkt bewerkstellt.

Die Dioxygenase setzt Antipyrin fast ebenso gut um wie das strukturell ähnliche Molekül des Pyrazons. Bei einer Substratkonzentration von 1,6 mM beträgt der Umsatz mit Antipyrin als Substrat 93% im Vergleich zur Reaktion mit Pyrazon (= 100%).

##### b) Dehydrogenase

Ein Enzymextrakt aus Pyrazon-abbauenden Bakterien setzt in Gegenwart von  $NAD^+$  I zum entsprechenden Brenzkatechinderivat des Antipyrins (II) um. Im Enzymrohextrakt liegen zwei Enzyme mit Diol-dehydrogenase-Aktivität vor.

Durch Chromatographie lassen sich die beiden Dehydrogenasen voneinander trennen und jeweils für sich reinigen (unveröffentlicht). Die beiden Enzme unterscheiden sich deutlich in ihren Eigenschaften. So ist Enzym A u. a. sehr substratspezifisch und katalysiert nur die Dehydrierung der *ortho*-Dihydrodihydroxy-Verbindungen des Pyrazons und des Antipyrins, wogegen Enzym B nicht sub-

stratspezifisch ist und auch die Diole, z. B. von Benzol oder Toluol, in die entsprechenden Brenzkatechine umwandelt.

Das substratspezifische Enzym A setzt I mit 150% um, bezogen auf den zu 100% gesetzten Umsatz der *ortho*-Dihydrodihydroxy-Verbindung von Pyrazon. Beim wenig substratspezifischen Enzym B beträgt der Umsatz von I 55%. Die Prozentangaben beziehen sich auf Messungen mit Substratkonzentrationen von 0,5 mM.

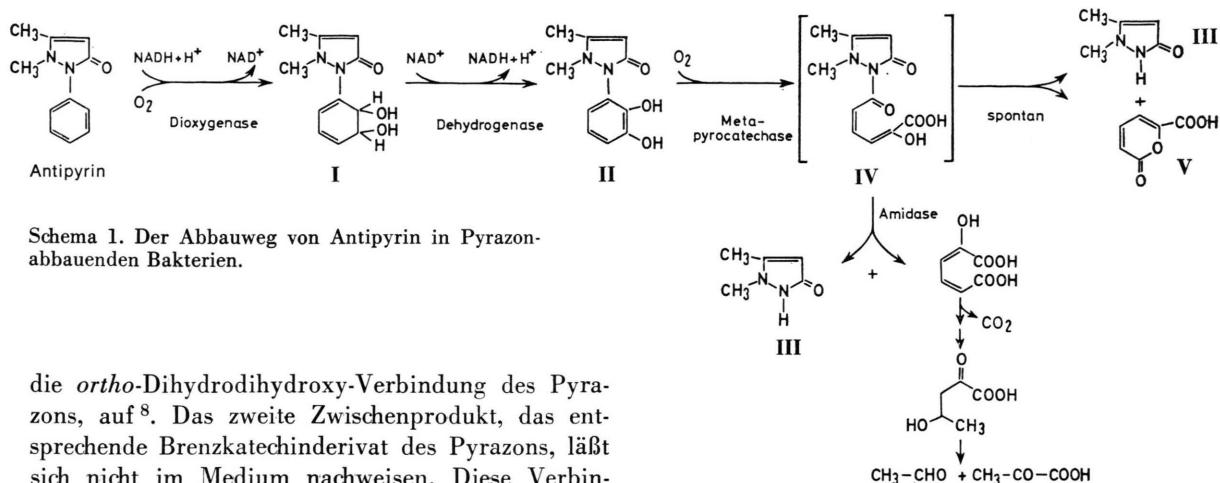
##### c) Metapyrocatechase

Reinigung und Eigenschaften der Metapyrocatechase aus Pyrazon-abbauenden Bakterien werden an anderer Stelle beschrieben<sup>7</sup>. Inkubiert man den Antipyrinmetaboliten II mit reiner Metapyrocatechase, dann findet man im Reaktionsansatz den entphenylierten Heterocyclus von Antipyrin (III) und 2-Pyon-6-carbonsäure (V). Bei dieser enzymatischen Reaktion tritt für ca. 30 sec eine intensive Gelbfärbung im Inkubationsansatz auf. Bei dem gelbgefärbten Zwischenprodukt handelt es sich vermutlich um die bei der *meta*-Spaltung zunächst entstehende Verbindung IV.

Bei einer Substratkonzentration von 0,4 mM beträgt der relative Umsatz von II 44%, der relative Umsatz des entsprechenden Brenzkatechinderivates von Pyrazon 27%, wobei der Umsatz mit unsubstituiertem Brenzkatechin als Substrat auf 100% festgesetzt wird.

#### Diskussion

Der Abbau von Antipyrin in Pyrazon-abbauenden Bakterien wird durch einen oxidativen Angriff am Phenylrest des Antipyrinmoleküls eingeleitet. Diese Oxidation wird von einer Dioxygenase katalysiert. In Gegenwart von NADH als Cosubstrat und unter Verbrauch von einem Molekül  $O_2$  wird Antipyrin in I umgewandelt. Der zweite Schritt des mikrobiellen Antipyrinabbaus wird von einer Dehydrogenase katalysiert. Mit  $NAD^+$  als Cosubstrat wird die *ortho*-Dihydrodihydroxy-Verbindung des Antipyrins (I) zum entsprechenden Brenzkatechinderivat (II) dehydriert. I und II, die beiden ersten Zwischenprodukte des Antipyrinabbaus, lassen sich auch im Medium des Stammes L der Pyrazon-abbauenden Bakterien nachweisen. Dagegen tritt bei der Züchtung von Stamm L oder Stamm E auf Pyrazon als Kohlenstoffquelle im Medium nur das erste Zwischenprodukt des Pyrazonabbaues, nämlich



Schema 1. Der Abbauweg von Antipyrin in Pyrazon-abbauenden Bakterien.

die *ortho*-Dihydrodihydroxy-Verbindung des Pyrazons, auf<sup>8</sup>. Das zweite Zwischenprodukt, das entsprechende Brenzkatechinderivat des Pyrazons, lässt sich nicht im Medium nachweisen. Diese Verbindung ist nur durch enzymatische oder chemische Synthese zugänglich<sup>9</sup>. Züchtet man anstelle des Stammes L den Stamm E der Pyrazon-abbauenden Bakterien auf Antipyrin, dann lässt sich ebenfalls nur das erste Zwischenprodukt des Abbaus (**I**) im Medium nachweisen. Für die geschilderten Unterschiede im Akkumulationsverhalten – zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen und auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen – sind vermutlich Unterschiede in den Enzymeigenschaften verantwortlich, wie unterschiedliche Substratspezifität und verschiedenartige Regulation der Enzyme.

Im weiteren Verlauf des Abbaus wird **II** durch eine Metapyrocatechase in *meta*-proximaler Stellung gespalten. Hierbei entsteht zunächst instabiles **IV**, das dann spontan in **III** und 2-Pyron-6-carbonsäure zerfällt.

Wir nehmen an, daß ähnlich wie bei der Umsetzung des Brenzkatechinderivates von Pyrazon instabiles **IV** sofort durch eine Amidase zu **III** und 2-Hydroxymuconsäure gespalten wird. In der Zelle scheint dieser Schritt von vorrangiger Bedeutung zu sein. 2-Hydroxymuconsäure wird von Pyrazon-abbauenden Bakterien enzymatisch decarboxyliert<sup>8</sup>. Hierbei entsteht 2-Keto-4-hydroxyvalericäure, die durch eine Aldolase zu den Intermediärstoffwechselprodukten Pyruvat und Acetaldehyd umgesetzt werden kann<sup>10</sup>.

Als Zusammenfassung der chemischen und enzymatischen Untersuchungsergebnisse ist in Schema 1 der Abbauweg des Antipyrins in Pyrazon-abbauenden Bakterien dargestellt. Im Endeffekt bedeutet dieser Abbau die Entphenylierung des Antipyrins, d. h. von den Bakterien wird lediglich der Phenylrest des Antipyrinmoleküls als Kohlenstoff- und Energie-

quelle verwertet. Der Pyrazolanteil des Antipyrins bleibt unverändert im Medium liegen. Die Pyrazon-abbauenden Bakterien können diesen Heterocyclus offenbar weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle verwenden.

Bei den Untersuchungen zum Metabolismus von Antipyrin in Säugetieren wurde als erster Metabolit das am Heterocyclus hydroxylierte 4-Hydroxyantipyrin nachgewiesen<sup>1, 2</sup>. Beim Menschen sollen 20–40% des eingenommenen Antipyrins als 4-Hydroxyantipyrin im Harn ausgeschieden werden. In neuerer Zeit wurden noch zwei weitere Antipyrinmetaboliten nachgewiesen. Bei Versuchen mit Menschen und mit Säugetieren (Ratten, Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen) wurden nach Verabreichung von Antipyrin neben 4-Hydroxyantipyrin auch größere Mengen an 3-Hydroxymethylantipyrin nachgewiesen<sup>11</sup>. Bei der gaschromatographischen Analyse des Urins von Menschen und von Versuchstieren konnte als weiterer Antipyrinmetabolit 3,4-Dihydroxyantipyrin identifiziert werden<sup>12</sup>. Die Autoren vermuten, daß dieser Metabolit über eine Epoxid-Zwischenstufe gebildet wird.

Alle bisher im Säugetier nachgewiesenen Metaboliten sind Verbindungen, welche am Heterocyclus des Antipyrins verändert sind.

Der hier vorgestellte, an Bakterien aufgeklärte Abbauweg zeigt dagegen erstmals, daß auch der Phenylrest des Antipyrins angegriffen und letztlich oxidativ entfernt werden kann.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Unterstützung dieser Arbeit.

- <sup>1</sup> J. Halberkann u. F. Fretwurst, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **285**, 97–127 [1950].  
<sup>2</sup> B. B. Brodie u. J. Axelrod, J. Pharmacol. Expt. Therap. **98**, 97–104 [1950].  
<sup>3</sup> C. Fröhner, O. Oltmanns u. F. Lingens, Arch. Mikrobiol. **74**, 82–89 [1970].  
<sup>4</sup> C. A. Rojahn, Ber. dt. Chem. Ges. **55**, 2959–2971 [1922].  
<sup>5</sup> K. Sauber, C. Fröhner, G. Rosenberg, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Biochem. **74**, 89–97 [1977].  
<sup>6</sup> L. E. Arnow, J. biol. Chem. **118**, 531–537 [1937].  
<sup>7</sup> R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **358**, 797–805 [1977].  
<sup>8</sup> E. de Frenne, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Biochem. **33**, 357–363 [1973].  
<sup>9</sup> S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, Biochem. Biophys. Res. Commun. **54**, 760–763 [1973].  
<sup>10</sup> F. Blobel, J. Eberspächer u. F. Lingens, Z. Naturforsch. **31c**, 757 [1976].  
<sup>11</sup> H. Yoshimura, H. Shimeno u. H. Tsukamoto, Chem. Pharm. Bull. **19**, 41–45 [1971].  
<sup>12</sup> M. Stafford, G. Kellermann, R. N. Stillwell u. M. G. Horning, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. **8**, 593–606 [1974].