

Umwandlung von [5'-³H]Riboflavin in 5,6-Dimethylbenzimidazol

Transformation of [5'-³H]Riboflavin into 5,6-Dimethylbenzimidazole

Bernhard Kolonko, Joachim A. Hörig, and Paul Renz

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim,
Garbenstraße 30, D-W-7000 Stuttgart 70, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **47c**, 171–176 (1992); received November 5, 1991

[5'-³H]Riboflavin, 5,6-Dimethylbenzimidazole, Vitamin B₁₂, *Propionibacterium shermanii*,
Corrinoid Biosynthesis

The 5,6-dimethylbenzimidazole unit of vitamin B₁₂ is formed from riboflavin *via* FMN in aerobic and some aerotolerant bacteria. Thereby C-1' of the ribityl side chain gets C-2 of 5,6-dimethylbenzimidazole. Experiments with homogenates of *Propionibacterium shermanii* on the fate of C-atoms 2' to 5' of the ribityl side chain of riboflavin in this transformation are reported. It was found that [5'-³H]riboflavin leads to radioactive sugar phosphates. These were isolated, dephosphorylated, and separated. Thus ³H-D-fructose and ³H-D-glucose were detected. The degradation of ³H-D-glucose revealed that 14 per cent of the total radioactivity was located in C-1, and 86 per cent in C-6. This indicates that during 5,6-dimethylbenzimidazole biosynthesis a three carbon unit is formed from the ribityl side chain of riboflavin.

Einleitung

Aerobe und einige aerotolerante Bakterien bilden die Vitamin B₁₂-Base 5,6-Dimethylbenzimidazol aus Riboflavin [1, 2]. Dieser Prozeß verläuft über FMN [2], das in Gegenwart von Sauerstoff in die Vitamin B₁₂-Base umgewandelt wird. Bei *Propionibacterium shermanii* konnten wir mit [1'-¹⁴C]Riboflavin zeigen, daß das C-1' der Ribitylseitenkette zu C-2 des 5,6-Dimethylbenzimidazols wird [3] (Abb. 1). Diese Untersuchungen wurden mit ganzen Zellen durchgeführt. Hierbei läuft die Biosynthese bis zum Vitamin B₁₂ ab und man muß die Basenkomponente durch Abbau isolieren.

Stellt man jedoch Zellhomogenate von Bakterien her, die ohne Zusatz eines Kobaltsalzes gezüchtet wurden, so kann man die aus Riboflavin gebildete Base abfangen. Hierzu muß allerdings die weitere Umsetzung zum α -Ribonucleosid-5'-phosphat [4] mit Nicotinsäure unterdrückt werden [2].

Sowohl das Schicksal des Rings C von Riboflavin, als auch das der C-Atome 2' bis 5' der Ribitylseitenkette bei der Umwandlung in 5,6-Dimethylbenzimidazol ist bisher nicht geklärt. Wir berichten hier über Versuche mit [5'-³H]Riboflavin zur Aufklärung der aus der Ribitylseitenkette entstehenden Produkte.

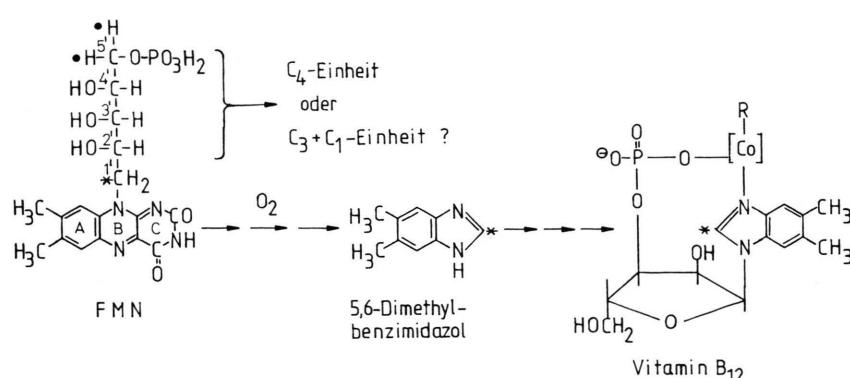


Abb. 1. Umwandlung von Flavimmononukleotid in 5,6-Dimethylbenzimidazol und dessen Verwertung zum Aufbau von Vitamin B₁₂ (schematisch). * = ¹⁴C-Markierung. ● = ³H in [5'-³H]Riboflavin. [Co] = Corrinring. R = 5'-Desoxyadenosyl (Coenzym B₁₂); R = CN: Cyanocobalamin.

Sonderdruckanforderungen an P. Renz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,
D-W-7400 Tübingen
0939–5075/92/0300–0171 \$ 01.30/0



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.

Material and Methoden

Alle Enzyme waren von Boehringer, Mannheim. Die Bestimmung der Konzentration von Glucose, Fructose, sowie von Zwischenprodukten der Glykolyse und von L-Glycerin-3-phosphat erfolgte nach [5]. Glucose und Fructose wurden außerdem durch Papierelektrophorese in 0,05 M Natriumgermanat-Puffer, pH 10,7 [6] (Anfärben mit Benzidin [7]) und durch Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel in Propanol-2/Ethylacetat/Toluol/H₂O (50/25/10/12,5) (Anfärben mit Anisidinhydrochlorid [8]) identifiziert.

Synthese von [5'-³H]Riboflavin

[5'-³H]-D-Ribose

5 mCi [2,8,5'-³H]Adenosin (Amersham Buchler, Braunschweig) wurden mit 67 mg (0,25 mmol) unmarkiertem Adenosin verdünnt, in 3 ml 0,2 N HCl gelöst und 40 min bei 100 °C gehalten. Nach Zusatz von 6 ml Wasser wurde über eine Säule von Dowex 50 WX8 (H⁺-Form, 2 ml) und Dowex 2 X4 (OH⁻-Form, 5 ml) filtriert. Das Eluat wurde i. Vak. zur Trockene eingedampft. Ausbeute 22,3 mg (60% d. Th.).

4,5-Dimethyl-2-nitro-N-(5'-³H)ribosylanilin

Dieses wurde aus obigen 22,3 mg [5'-³H]-D-Ribose, 15,2 mg unmarkierter Ribose und 187 mg 4,5-Dimethyl-2-nitroanilin wie von Kuhn und Ströbele [9] beschrieben hergestellt. Ausbeute 67 mg (90% d. Th.).

[5'-³H]Riboflavin

67 mg 4,5-Dimethyl-2-nitro-N-(5'-³H)ribosylanilin wurden nach [9] zu [5'-³H]Riboflavin umgesetzt. Das Rohprodukt wurde in Wasser gelöst und auf eine Säule (2 × 15 cm) von Amberlite XAD-2 (100–200 mesh) aufgetragen. Die Säule wurde mit 300 ml Wasser gewaschen und das [5'-³H]Riboflavin mit tert. Butanol/H₂O (5/95) eluiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Ausbeute 15,8 mg (19% d. Th.). Weitere Reinigung durch absteigende Chromatographie auf Whatman 3 MM-Papier (19 × 48) mit 2-Butanol/H₂O/Eisessig (70/30/1). Spezifische Radioaktivität des so erhaltenen reinen Riboflavins 8,2 × 10⁶ dpm/μmol.

*Inkubation von [5'-³H]Riboflavin mit Zellhomogenat von *Propionibacterium shermanii* St 33 und Isolierung der radioaktiven Glucose und Fructose*

Die Züchtung der Bakterien und die Herstellung des Homogenats wurde wie in [2] beschrieben durchgeführt. 9,5 ml *P. shermanii*-Homogenat wurden mit 0,5 ml (0,5 μmol) einer wässrigen Lösung von [5'-³H]Riboflavin (8,2 × 10⁶ dpm/μmol) und 0,2 ml einer 1,33 M Natriumnicotinat-Lösung, pH 6,5, unter Schütteln (110 rev/min) 5 h bei 30 °C inkubiert. Das Homogenat wurde mit 2 ml 70-proz. Perchlorsäure versetzt, 30 min bei 0 °C gerührt, abzentrifugiert, der klare Überstand mit 5 N KOH auf pH 7 gebracht und 30 min bei 0 °C gehalten. Das KClO₄ wurde abzentrifugiert und der Überstand i. Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml 1-proz. wässriger Essigsäure aufgenommen, auf eine Säule (2,7 × 90 cm) von Sephadex G 10 aufgetragen und mit 1-proz. Essigsäure in 10 ml-Fraktionen eluiert. 0,1 ml-Aliquots jeder Fraktion wurden auf Radioaktivität, 0,05 ml-Aliquots mit Phenol/H₂SO₄ [10] auf Zucker untersucht. Die Fraktionen 17–25 waren bei beiden Tests positiv. Sie wurden gepoolt und i. Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Wasser gelöst, auf eine Dowex 1 X 8-Formiat-Säule (200–400 mesh, 0,8 × 20 cm) aufgegeben und mit 100 ml Wasser gewaschen. Es wurde mit einem linearen Ameisensäure-Gradienten (2–3 M, Gesamtvolumen 200 ml) eluiert und in 10 ml-Fraktionen gesammelt. Die radioaktiven Zuckerphosphate befanden sich in den Fraktionen 5–7. Diese wurden vereinigt, zur Trockene eingedampft, in 7 ml 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0, aufgenommen und mit 14 mg saurer Phosphatase 48 h bei 37 °C inkubiert.

Das Enzym wurde durch Erhitzen (3 min, 100 °C) denaturiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde über Dowex 50 H⁺ und Dowex 1 X 8-acetat filtriert, i. Vak. eingedampft, in 2 ml 30-proz. wässrigem Methanol aufgenommen und auf eine Dowex 50 W X 8-Säule (Ca²⁺-Form, 200–400 mesh, 0,8 × 170 cm) gegeben [11, 12]. Die Zucker wurden mit 30-proz. Methanol bei 4 °C in 5 ml-Fraktionen eluiert. ³H-D-Glucose war in den Fraktionen 10–19, ³H-D-Fructose in den Fraktionen 22–31 enthalten. Die weitere Reinigung erfolgte durch absteigende Papierchromatographie auf Whatman 3 MM-Papier (19 × 48 cm) mit Pro-

anol-2/Ethylacetat/Toluol/H₂O (50/25/10/12,5). Die radioaktiven Zonen wurden mit dem Scanner LB 2722 der Fa. Berthold (Wildbad) lokalisiert, Glucose und Fructose anhand von mitgelaufenen Vergleichssubstanzen identifiziert (Nachweis mit 3-proz. Anisidinhydrochlorid in *n*-Butanol [8]). Die Zonen der radioaktiven Glucose bzw. Fructose wurden mit Wasser eluiert und über Aktivkohle/Celite (1/1) filtriert [13]. Die Ausbeuten sind in Tab. I gezeigt.

Der Abbau der Glucose erfolgte weitgehend nach Verfahren, die in der Literatur beschrieben sind [14, 15]. Für eine detaillierte Beschreibung siehe [16].

Abbau der ³H-D-Glucose zu L-Glycerin-3-phosphat (C-Atome 3 bis 1 der Glucose) und D-Glycerinsäure-3-phosphat (C-Atome 4 bis 6 der Glucose) [14]

19 µmol ³H-D-Glucose (spez. Radioakt. 8080 dpm/µmol) wurden wie von Schmidt *et al.* [14] beschrieben zu 15 µmol L-Glycerin-3-phosphat (79% d. Th.) und 10 µmol D-Glycerinsäure-3-phosphat (53% d. Th.) abgebaut und über Dowex 1 X 8-acetat voneinander getrennt. Das Prinzip dieses Abbaus und des weiteren Abbaus von D-Glycerinsäure-3-phosphat und L-Glycerin-3-phosphat ist in Abb. 2 geschildert.

Umwandlung von D-Glycerinsäure-3-phosphat in D-Glycerinsäure und deren Spaltung mit Perjodat

Dieser Abbau wurde wie in [15] beschrieben durchgeführt. Aus 9 µmol D-Glycerinsäure-3-phosphat wurden durch Spaltung mit saurer Phosphatase 8 µmol D-Glycerinsäure erhalten (89% d. Th.). Für die anschließende Spaltung der D-Glycerinsäure mit Natriumperjodat wurden 7,5 µmol der radioaktiven Glycerinsäure mit 160 µmol Calcium-D-Glycerat verdünnt. 150 µmol dieser D-Glycerinsäure wurden mit NaJO₄ abgebaut [15] und der aus dem C-3 der Glycerinsäure entstandene Formaldehyd abdestilliert. Aus dem Destillat (*ca.* 9 ml) wurde der Formaldehyd als Dimedonderivat wie in [17] beschrieben gefällt. Ausbeute 13,4 mg (46 µmol, 31% d. Th.). Von dem in Ethanol gelösten Produkt wurden Aliquots zur Radioaktivitätstsmessung verwendet.

Umwandlung von L-Glycerin-3-phosphat in D-Glycerinsäure-3-phosphat und dessen weiterer Abbau

13 µmol L-Glycerin-3-phosphat wurden nach [15] in D-Glycerinsäure-3-phosphat umgewandelt. Ausbeute 7 µmol (53% d. Th.). 4,7 µmol dieses D-Glycerinsäure-3-phosphats wurden wie beschrieben [15] zu D-Glycerinsäure dephosphoryliert und der Perjodatspaltung unterworfen. Der abdestillierte Formaldehyd (*ca.* 4 ml) wurde auf ein Volumen von 5 ml gebracht und seine Konzentration kolorimetrisch bestimmt [18].

Die für eine Eichkurve benötigte genaue Konzentration von käuflicher Formaldehyd-Lösung wurde mit der Natriumsulfit-Methode [17] ermittelt. Die Ausbeute an Formaldehyd aus dem Abbau der Glycerinsäure betrug 0,7 µmol (15% d. Th.). Die Radioaktivität wurde in 4 ml der obigen Formaldehyd-Lösung bestimmt.

Ergebnisse

*Inkubation von [5'-³H]Riboflavin mit einem Zellhomogenat von *Propionibacterium shermanii* und Isolierung der dabei gebildeten Monosaccharide*

Ein Zellhomogenat von *P. shermanii* wurde mit [5'-³H]Riboflavin unter aeroben Bedingungen inkubiert. Hierbei bildete sich [5'-³H]Riboflavin-5'-phosphat (FMN), das unter den Versuchsbedingungen (siehe Material und Methoden) zu etwa 40% in 5,6-Dimethylbenzimidazol umgewandelt wurde. Die dabei aus der Ribitylseitenkette gebildeten radioaktiven Zuckerphosphate wurden mit saurer Phosphatase dephosphoryliert. Das entstandene Gemisch von Monosacchariden konnte an Dowex 50 WX 8 in der Ca²⁺-Form aufgetrennt werden (Abb. 3). Die Radioaktivität wurde in Glucose und Fructose gefunden. Wie in der Literatur beschrieben [19], wurde bei Glucose eine Auf trennung der α - und β -Form an Dowex 50-Ca²⁺ beobachtet. Die beiden ³H]-Monosaccharide wurden in den gleichen Fraktionen wie nichtradioaktive Glucose bzw. Fructose von der Säule eluiert und somit identifiziert. Die Identität dieser Zucker wurde außerdem durch Papierelektrophorese und Dünnschicht-Chromatographie sowie durch enzymatische Analyse ermittelt.

Tab. I gibt die Ausbeuten und die spezifische Radioaktivität der beiden Monosaccharide wieder. Die spezifische Radioaktivität der ³H-D-Fruc-

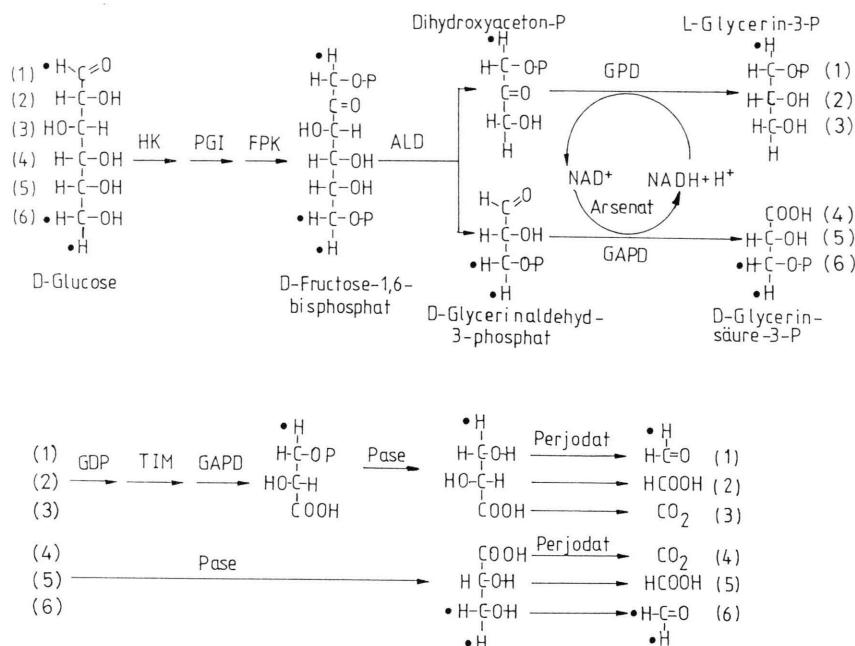
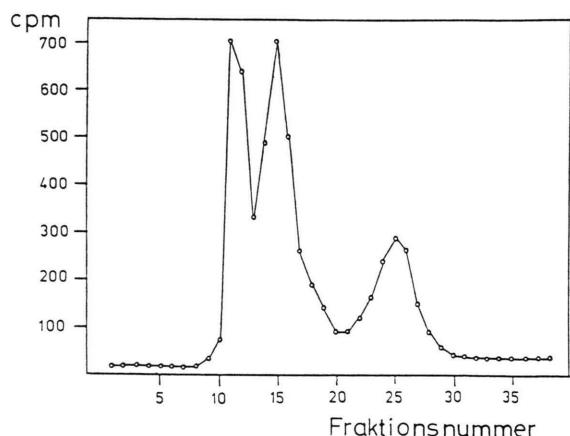


Abb. 2. Abbau von ³H-D-Glucose zur Ermittlung der Position des ³H (●) im Molekül. Aus der Numerierung der C-Atome der Glucose (Zahlen in Klammern) ist ersichtlich, welche C₁-Bruchstücke aus diesen C-Atomen entstehen. HK = Hexokinase, PGI = Phosphoglucose-Isomerase, FPK = Fructose-6-phosphatkinase, ALD = Aldolase, GPD = Glycerin-3-phosphatdehydrogenase, GAPD = Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, TIM = Triosephosphatiso-merase, Pase = Phosphatase, P = PO₃H₂.



tose ist wesentlich höher als die der ³H-D-Glucose. Die relativ große Menge an ³H-D-Glucose ist auf unmarkierte Glucose zurückzuführen, die von der Züchtung der *P. shermanii*-Zellen mit dieser C-Quelle stammt und teilweise in Form eines überwiegend aus Glucose bestehenden Polysaccharids [20] gespeichert wurde.

Abb. 3. Chromatographie an Dowex 50 WX8-Ca²⁺ (0,8 × 170 cm) der bei der Umwandlung von [5'-³H]Riboflavin in 5,6-Dimethylbenzimidazol durch *P. shermanii*-Homogenate entstandenen [³H]Monosaccharide. Elution mit 30-proz. wässrigem Methanol bei 4 °C. 5 ml-Fraktionen. Messung der Radioaktivität in 0,1 ml-Aliquots. 1. Peak: β-D-Glucose. 2. Peak: α-D-Glucose. 3. Peak: Fructose.

Tab. I. Menge und spezifische Radioaktivität der nach Inkubation eines *P. shermanii*-Homogenats mit [5'-³H]Riboflavin erhaltenen Monosaccharide.

Verbindung	Spez. Radioaktivität [dpm/μmol]	Eingesetzte bzw. isolierte Menge [μmol]
[5'- ³ H]Riboflavin	8 200 000	0,5
³ H-D-Fructose	634 000	0,1
³ H-D-Glucose	8 080	42,0

Abbau der ³H-D-Glucose zur Ermittlung der Position der ³H-Markierung

Dieser wurde wie von Schmidt et al. [14] und von Genovese et al. [15] beschrieben durchgeführt. Das Prinzip dieses Abbaus ist in Abb. 2 erläutert. Die Ergebnisse zeigt Tab. II. Daraus geht eindeutig hervor, daß die aus der Ribitylseitenkette von [5'-³H]Riboflavin gebildete Glucose in 1- und 6-Stellung ³H-markiert war. Bezogen auf die spezifische Radioaktivität des Glycerinsäure-3-phosphats (Tab. II) waren an C-1 13,8% und an C-6 85,6% des gesamten ³H gebunden.

Diskussion

Die Markierung der ³H-D-Glucose in 1- und 6-Stellung beweist, daß bei der Umwandlung des [5'-³H]Riboflavins in 5,6-Dimethylbenzimidazol aus der Ribitylseitenkette eine C₃-Verbindung entsteht (Abb. 1). Bei dieser C₃-Verbindung könnte es sich um 3-³H-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat handeln. Dieses liefert im Zuge der Gluconeogenese

D-Glucose-6-phosphat mit der hier beobachteten Verteilung der Radioaktivität. Ebenso ist die Bildung von [3-³H]Dihydroxyaceton-3-phosphat aus der Ribitylseitenkette denkbar. Sie würde zum gleichen Ergebnis führen. Allerdings fanden Stjernholm und Wood [21, 22] bei Versuchen mit intakten Zellen von *P. shermanii*, die sie unter anaeroben Bedingungen durchführten, einen Leerlauf-Zyklus (futile cycle). Hierbei wird Dihydroxyacetonphosphat dephosphoryliert und rephosphoryliert. Dies bewirkt, daß aus [3-¹⁴C]Dihydroxyaceton-3-phosphat Glucose entsteht, die nicht nur in C-1 und C-6, sondern auch in C-3 und C-4 markiert ist.

Die bei unseren Versuchen gefundene Verteilung der Radioaktivität in der Glucose zeigt, daß in aufgebrochenen Zellen unter aeroben Bedingungen dieser Leerlauf-Zyklus nicht abläuft.

Eine Spaltung zwischen C-1' und C-2' der Ribitylseitenkette unter Bildung von 4-³H-D-Erythrose (Abb. 1) kann ausgeschlossen werden, da aus diesem Spaltprodukt nur in 6-Stellung markierte Hexosephosphate entstehen würden.

Tab. II. Ergebnisse des enzymatischen Abbaus der ³H-D-Glucose zur Lokalisierung der Tritium-Markierung. In Klammern ist jeweils die prozentuale Ausbeute der entsprechenden Reaktion angegeben. P = Phosphat.

Verbindung	Spezifische Radioaktivität [dpm/μmol]	Menge μmol [%]
³ H-D-Glucose		
isoliert	8080	42 (100)
weiter abgebaut	8080	19 (45)
Obere Hälfte der ³ H-D-Glucose (C-1 bis C-3)		
³ H-L-Glycerin-3-P		
isoliert	1500	15 (79)
weiter abgebaut	1500	13 (68)
³ H-D-Glycerinsäure-3-P		
isoliert	1120	7 (53)
weiter abgebaut	1120	5 (38)
[³ H]Formaldehyd	1340	0,7 (14)
Untere Hälfte der ³ H-D-Glucose (C-4 bis C-6)		
³ H-D-Glycerinsäure-3-P		
isoliert	6920	10 (53)
weiter abgebaut	6920	9 (47)
³ H-D-Glycerinsäure		
isoliert	7230	8 (89)
verdünnt und weiter abgebaut	350	150 (100)
[³ H]Methylen-bis-dimedon	330	46 (31)

Allerdings muß eine Spaltung unter Bildung von D-Erythrit-4-phosphat (L-Erythrit-1-phosphat) in Betracht gezogen werden. Dies geht aus Untersuchungen mit *Propionibacterium acidi-propionici* hervor. Dieser Organismus ist mit *P. shermanii* nahe verwandt. Beide Organismen können Erythrit verwerten.

Bei *P. acidi-propionici* wurde gefunden, daß Erythrit über L-Erythrit-1-phosphat und L-Erythrulose-1-phosphat verwertet wird [23, 24]. Letzteres wird in Dihydroxyacetonphosphat und Formaldehyd gespalten. Das Dihydroxyacetonphosphat könnte dann zum Aufbau von Glucose-6-phosphat verwertet werden.

Wir fanden jedoch bei Versuchen mit *P. shermanii*-Homogenaten und mit [2'-¹⁴C]Riboflavin, daß bei dessen Umwandlung in 5,6-Dimethylbenzimidazol sowohl radioaktives CO₂ als auch radioaktive Kohlenhydrate entstehen (J. Schneider und

P. Renz, unveröffentlicht). Vermutlich ist das CO₂ ein Primärprodukt, das in der Folge zum Teil in Kohlenhydraten fixiert wird [25].

Versuche zur Anreicherung des Enzymsystems, das die Umwandlung von Flavinmononukleotid in 5,6-Dimethylbenzimidazol katalysiert, sind zur Zeit im Gange. Sollten sie erfolgreich sein, könnten die neben 5,6-Dimethylbenzimidazol entstehenden Spaltprodukte direkt nachgewiesen werden.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit. Der Fa. Roquette (Frankfurt/Main) danken wir für die Bereitstellung von Cornsteep-Pulver für die Fermentationen.

- [1] V. Höllriegl, L. Lamm, J. Rowold, J. Hörig und P. Renz, Arch. Microbiol. **132**, 155–158 (1982).
- [2] J. A. Hörig und P. Renz, Eur. J. Biochem. **105**, 587–592 (1980).
- [3] P. Renz und R. Weyhenmeyer, FEBS-Letters **22**, 124–126 (1972).
- [4] H. C. Friedmann und D. L. Harris, J. Biol. Chem. **240**, 406–412 (1965).
- [5] Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer, ed.), Band **II**, Abschnitt D: Methoden zur Bestimmung von Metaboliten. I. Substanzen im Kohlenhydratstoffwechsel, S. 1171 ff. Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- [6] B. Lindberg und B. Swan, Acta Chem. Scand. **14**, 1043–1050 (1960).
- [7] B. C. Chan und J. C. Cain, Nature **192**, 69–70 (1961).
- [8] L. Hough, J. K. N. Jones und W. H. Wadman, J. Chem. Soc. **1950**, 1702–1706.
- [9] R. Kuhn und R. Ströbele, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **70**, 773–787 (1937).
- [10] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers und F. Smith, Anal. Chem. **28**, 350–356 (1956).
- [11] S. J. Angyal, G. S. Bethell und R. J. Beveridge, Carbohydr. Res. **73**, 9–18 (1979).
- [12] S. J. Angyal, Tetrahedron **30**, 1695–1702 (1974).
- [13] R. L. Whistler und D. F. Durso, J. Am. Chem. Soc. **72**, 677–679 (1950).
- [14] K. Schmidt, J. Genovese und J. Katz, Anal. Biochem. **34**, 170–179 (1970).
- [15] J. Genovese, K. Schmidt und J. Katz, Anal. Biochem. **34**, 161–169 (1970).
- [16] B. Kolonko, Dissertation, Universität Hohenheim, 1984.
- [17] F. J. Walker, Quantitative analysis of formaldehyde solutions and polymers, in: formaldehyde (F. J. Walker, ed.), p. 379, Reinhold Publishing Corporation, New York 1953.
- [18] J. Chrastil und J. T. Wilson, Anal. Biochem. **63**, 202–207 (1975).
- [19] R. W. Goulding, J. Chromatogr. **103**, 229–239 (1975).
- [20] R. Stjernholm und H. G. Wood, J. Biol. Chem. **235**, 2753–2756 (1960).
- [21] R. Stjernholm und H. G. Wood, J. Biol. Chem. **235**, 2757–2761 (1960).
- [22] H. G. Wood, Curr. Top. Cell. Regul. **18**, 255–287 (1981).
- [23] E. J. Wawszkiewicz und H. A. Barker, J. Biol. Chem. **243**, 1948–1955 (1968).
- [24] E. J. Wawszkiewicz, Biochemistry **7**, 683–687 (1968).
- [25] H. G. Wood und C. H. Werkman, Biochem. J. **30**, 48–53 (1936).