

Herstellung der 6- und 6'-Desoxycellobiose

I. JEŽO und J. ZEMEK

*Chemisches Institut, Zentrum für Chemische Forschung
der Slowakischen Akademie
der Wissenschaften, CS-842 38 Bratislava*

Eingegangen am 13. September 1985

Es wird die Herstellung der 6- und 6'-Desoxycellobiose aus Phenyl- resp. Methyl- β -cellobiosid beschrieben.

The preparation of 6- and 6'-deoxycellobiose from phenyl- or methyl- β -cellobioside is described.

Описано получение 6- и 6'-дезоксигеллобиозы из фенол- или метил- β -целлобиозида.

Die Herstellung der 6,6'-Didesoxycellobiose [1] so wie auch der 6-Desoxycellobiose [2] ist aus Fachliteratur schon länger bekannt. Dagegen die Herstellung der 6'-Desoxycellobiose ist bisher nicht beschrieben und deshalb widmeten wir unsere Aufmerksamkeit der Synthese dieser Verbindung; gleichzeitig beschrieben wir ein alternatives, bisher nicht beschriebenes Verfahren zur Herstellung der 6-Desoxycellobiose.

Die gewünschten Verbindungen haben wir folgend hergestellt. (Die Ausgangsverbindungen sind rein zufällig ausgewählt.)

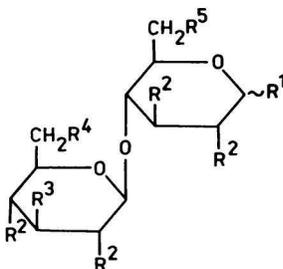
a) 6-Desoxycellobiose

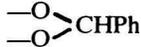
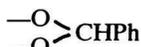
Durch Reaktion des Phenyl- β -cellobiosids mit Benzaldehyd bei Anwesenheit von $ZnCl_2$ (wasserfrei), die mit nachfolgender Acetylierung verbunden ist, gewinnt man Phenyl-2,2',3,3',6-penta-*O*-acetyl-4',6'-*O*-benzyliden- β -cellobiosid (I) und nach Deacetylierung aus ihm Phenyl-4',6'-*O*-benzyliden- β -cellobiosid (II). Tosylierung des II, verbundene mit nachfolgender Acetylierung ergibt Phenyl-2,2',3,3'-tetra-*O*-acetyl-4',6'-*O*-benzyliden-6-*O*-*p*-toluolsulfonyl- β -cellobiosid (III) und aus ihm nach Austausch der Tosylgruppe gegen Jod Phenyl-2,2',3,3'-tetra-*O*-acetyl-4',6-*O*-benzyliden-6-desoxy-6-jod- β -cellobiosid (IV). Durch katalytische Hydrierung von IV gewinnt man Cyclohexyl-2,2',3,3'-tetra-*O*-acetyl-6-desoxy- β -cellobiosid (V), welches nach Acetolyse auf 1,2,2',3,3',4',6-Hepta-*O*-acetyl-6-desoxy- α -cellobiose (VI) und diese nach Deacetylierung schließlich auf 6-Desoxycellobiose (VII) übergeht.

b) 6'-Desoxycellobiose

Ähnlich wie ad a) durch Tosylierung des Methyl- β -cellobiosids, verbundene mit nachfolgender Acetylierung erhält man Methyl-2,2',3,3',4',6-hexa-*O*-acetyl-6'-*O*-*p*-toluolsulfonyl- β -cellobiosid (VIII) und aus ihm nach Austausch der Tosylgruppe gegen Jod Methyl-2,2',3,3',4',6-hexa-*O*-acetyl-6'-desoxy-6'-jod- β -cellobiosid (IX). Durch katalytische Hydrierung von IX entsteht Methyl-2,2',3,3',4',6-desoxy- β -cellobiosid (X), das nach Acetolyse 1,2,2',3,3',4',6'-Hepta-*O*-acetyl-6'-desoxy- α -cellobiosid (XI) und schließlich nach Deacetylierung 6'-Desoxycellobiose (XII) ergibt.

Die als Standard verwendete 6,6'-Didesoxycellobiose wurde aus einem Gemisch, gewonnenen nach Cellulasehydrolyse der Cellulose (mittels β -1,4-Glucan-glucanohydrolase EC 3.2.1.4), enthaltende inkorporierte 6-Desoxy-D-glucose-einheiten, isoliert, aber auch durch Synthese [1] hergestellt.



I	R ¹ = —OPh	R ² = —OAc	R ³ , R ⁴ = 	R ⁵ = —OAc
II	R ¹ = —OPh	R ² = —OH	R ³ , R ⁴ = 	R ⁵ = —OH
III	R ¹ = —OPh	R ² = —OAc	R ³ , R ⁴ = 	R ⁵ = —Ts
IV	R ¹ = —OPh	R ² = —OAc	R ³ , R ⁴ = 	R ⁵ = —I
V	R ¹ = —OC ₆ H ₁₁	R ² = —OAc	R ³ , R ⁴ = —OH	R ⁵ = —H
VI	R ¹ = —OAc	R ² = —OAc	R ³ , R ⁴ = —OAc	R ⁵ = —H
VII	R ¹ = —OH	R ² = —OH	R ³ , R ⁴ = —OH	R ⁵ = —H
VIII	R ¹ = —OCH ₃	R ² , R ³ , R ⁵ = —OAc		R ⁴ = —OTs
IX	R ¹ = —OCH ₃	R ² , R ³ , R ⁵ = —OAc		R ⁴ = —I
X	R ¹ = —OCH ₃	R ² , R ³ , R ⁵ = —OAc		R ⁴ = —H
XI	R ¹ = —OAc	R ² , R ³ , R ⁵ = —OAc		R ⁴ = —H
XII	R ¹ = —OH	R ² , R ³ , R ⁵ = —OH		R ⁴ = —H

Ac — Acetyl; PhCH = Benzyliden; C₆H₁₁ = Cyclohexyl; Ph = Phenyl;
Ts = *p*-Toluolsulfonyl.

Schließlich widmeten wir unsere Aufmerksamkeit auch der enzymatischen Hydrolyse der Cellobiose und ihren 6-, 6'- und 6,6'-Desoxyderivaten. Die Hydrolyse haben wir mit β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) unter den in [3] angeführten Bedingungen durchgeführt und wir verfolgten diese kolorimetrisch [4] aber auch chromatographisch. Erzielte Resultate haben wir in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Charakteristik der Cellobiose und ihrer Desoxyderivate

Verbindung	$K_m / (\text{mmol dm}^{-3})$		$v_{r.o}$		R_{Gte}
	a	b	a	b	
Cellobiose	1,7	1,42	1,00	1,00	0,37
6-Desoxycellobiose	28,3	35,7	0,42	0,38	0,65
6'-Desoxycellobiose	21,1	30,1	0,59	0,45	0,61
6,6'-Didesoxycellobiose	35,5	40,8	0,25	0,17	0,76

a) β -Glucosidase aus Süßmandeln.

b) β -Glucosidase aus *Trichosporon cutaneum*.

$v_{r.o}$ = relative Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von Cellobiosederivaten bezogene auf die Geschwindigkeit der Cellobiosehydrolyse = 1.

Experimenteller Teil

Der Ausdruck „verdampft...“ u. ä. bedeutet die Abdampfung des Lösungsmittels im Wasserstrahlpumpenvakuum bei max. 50 °C. Das Trocknen der Lösungen wurde mittels Na_2SO_4 und die Entfärbung mit Aktivkohle durchgeführt. Alle verwendeten Lösungsmittel (wenn nicht anders angedeutet ist) waren wasserfrei.

Die optischen Messungen waren mit Perkin 141 Polarimeter (100 mm Röhrchen), $[\alpha]$ (λ_D , $\theta = 20$ °C, $\rho = 10$ g dm^{-3} in ...), die IR-Spektren mit Perkin—Elmer 983 G Spektrometer durchgeführt.

Sämtliche Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Phenyl-2,2',3,3',6-penta-O-acetyl- -4',6'-O-benzyliden- β -cellobiosid (I)

Ein Gemisch von 3,7 g Phenyl- β -cellobiosid [5], 25 cm^3 Benzaldehyd und 4 g ZnCl_2 (wasserfrei) wird 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird zuerst mit Petroläther (3×30 cm^3) und dann mit Äther (2×30 cm^3) trituriert. Nach Absaugen übergießt man den unlöslichen Anteil mit Pyridin (50 cm^3), man schüttelt das Gemisch 1 h, nach Absaugen gibt man in das Filtrat Acetanhydrid (10 cm^3) hinzu und läßt es 24 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Eingießen in Eiswasser (400 cm^3) wird das ausgeschiedene

Produkt abgesaugt, gründlich mit Wasser durchgewaschen und nach Abtrocknen aus Äthanol umkristallisiert (5,35 g; 84 %). Schmp. = 246—247 °C; $[\alpha]$ (CHCl₃) = -51,5°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (Nujol)/cm⁻¹: 760 (Ph), 900 (β -Glycosid), 1050 (Acetal), 1380, 1460 (Ph), 1740 (—OAc).

Für C₃₅H₄₀O₁₆ (M_r = 716,67) w_i (berechnet): 58,65 % C, 5,62 % H; w_i (gefunden): 58,39 % C, 5,65 % H.

Phenyl-4',6'-O-benzyliden- β -cellobiosid (II)

In eine warme Lösung von 5,2 g *I* in Methanol (250 cm³) gibt man 10 cm³ 0,3 M-CH₃ONa hinzu und das Reaktionsgemisch wird 6 h unter dem Rückfluß gekocht. Nach Deionisierung (Zerolit-225 (H⁺)), Abdampfen auf 1/3 des Volumens und nachfolgender Verdünnung mit Wasser erhält man ein Produkt (2,3 g; 62 %) mit Schmp. = 211—212 °C (EtOH); $[\alpha]$ (Pyridin) = -58°.

Für C₂₅H₃₀O₁₁ (M_r = 506,49) w_i (berechnet): 59,28 % C, 5,97 % H; w_i (gefunden): 59,12 % C, 6,03 % H.

Phenyl-2,2',3,3'-tetra-O-acetyl-4',6'-O-benzyliden- -6-O-p-toluolsulfonyl- β -cellobiosid (III)

In eine Lösung von 2,2 g *II* in Pyridin (40 cm³) gibt man 1,2 g *p*-Toluolsulfonylchlorid hinzu und das Reaktionsgemisch läßt man 24 h bei Raumtemperatur stehen. Danach wird Acetanhydrid (10 cm³) zugegeben und man läßt das Gemisch abermals 24 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Verdünnung mit Wasser (400 cm³) wird das ausgeschiedene Produkt abgesaugt, mit Wasser durchgewaschen und nach Abtrocknen aus Äthanol umkristallisiert (3,7 g; 91 %). Schmp. = 215—217 °C (Zerset.); $[\alpha]$ (CHCl₃) = -68,6°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (Nujol)/cm⁻¹: 720 (Ph), 920 (β -Glycosid), 960, 970 (CH₂=), 1030, 1060, 1085 (Acetal), 1230, 1375, 1460, 1590 (CH₃; Tosyl), 1740 (—OAc).

Für C₄₀H₄₄O₁₇S (M_r = 828,81) w_i (berechnet): 57,96 % C, 5,35 % H, 3,87 % S; w_i (gefunden): 58,02 % C, 5,39 % H, 3,78 % S.

Phenyl-2,2',3,3'-tetra-O-acetyl-4',6'-O-benzyliden- -6-desoxy-6-jod- β -cellobiosid (IV)

Ein Gemisch von 1,1 g *III*, 1 g NaI (wasserfrei) und 60 cm³ Aceton erwärmt man 8 h im Druckgefäß auf 120—130 °C. Nach Abkühlung, Filtrierung und Abdampfen des Filtrats übergießt man den Destillationsrückstand mit CHCl₃, die Suspension wird mit Wasser (1 % Na₂S₂O₃) durchgeschüttelt und nach Abtrocknen das gewonnene Produkt aus Äthanol umkristallisiert (0,78 g; 75 %). Schmp. = 256—257 °C; $[\alpha]$ (CHCl₃) = -65,3°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (Nujol)/cm⁻¹: 700 (Ph), 750 (Hal), 895 (β -Glycosid), 1060, 1175 (Acetal), 1370 (CH₃), 1740 (—OAc).

Für C₃₃H₃₇IO₁₄ (M_r = 784,59) w_i (berechnet): 50,52 % C, 4,75 % H, 16,18 % I; w_i (gefunden): 50,50 % C, 4,80 % H, 16,10 % I.

*Cyclohexyl-2,2',3,3'-tetra-O-acetyl-
-6-desoxy-β-cellobiosid (V)*

In eine Lösung von 0,73 g IV in Essigsäureäthylester (100 cm³) und Triäthylamin (3 cm³) wird 1 g Pd/C (*w*(Pd) = 10 %) zugegeben und das Reaktionsgemisch dann bei Raumtemperatur bis zum Aufhören der Wasserstoffabsorption (*V*(H₂) ≈ 140 cm³, θ = 20 °C) hydriert. Nach Beseitigung des Katalysators dampft man das Filtrat ab und den Destillationsrückstand kristallisiert man aus Methanol um (0,54 g; ca. 100 %). Schmp. = 237—238 °C; [*α*] (CHCl₃) = -56,9°.

Für C₂₆H₄₀O₁₁ (*M_r* = 576,58) *w_i*(berechnet): 54,16 % C, 6,99 % H; *w_i*(gefunden): 54,25 % C, 7,05 % H.

*1,2,2',3,3', 4',6'-Hepta-O-acetyl-
-6-desoxy-α-cellobiose (VI)*

Zu 3 cm³ eines Gemisches von Acetanhydrid + Essigsäure + konzent. H₂SO₄ (Volumenverhältnis = 10 : 10 : 1) gibt man bei 0 °C 0,5 g von V hinzu und läßt das Reaktionsgemisch 45 min bei Raumtemperatur stehen. Nach Eingießen in gesättigte NaHCO₃-Lösung (0 °C, 100 cm³) und 1 h Stehen bei Raumtemperatur extrahiert man das ausgeschiedene Produkt mit CHCl₃, man trocknet den Extrakt und nach Entfärbung dampft man das Filtrat ab. Das gewonnene Produkt (0,32 g; 60 %) hat Schmp. = 190—191 °C (CHCl₃ + Petroläther); [*α*] (CHCl₃) = +23,8°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹: 750 (CH—), 825 (α-Glycosid), 1050 (Acetal), 1430 (CH₃), 1740 (—OAc), 2900 (CH—).

Für C₂₆H₃₆O₁₇ (*M_r* = 620,55) *w_i*(berechnet): 50,32 % C, 5,85 % H; *w_i*(gefunden): 50,20 % C, 5,90 % H.

6-Desoxycellobiose (VII)

In eine Lösung von 0,3 g VI in Methanol (10 cm³) wird 0,5 cm³ 0,1 M-CH₃ONa zugegeben und das Reaktionsgemisch läßt man 48 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels löst man den Destillationsrückstand im Wasser, die Lösung wird nach Stehen mit Zerolit-225 (H⁺) (10 min) deionisiert und das Filtrat wieder abgedampft. Das gewonnene Produkt (0,14 g; 89 %) hat Schmp. = bei 206—208 °C weicht, 240—242 °C (Zersetz.) (MeOH + Et₂O); [*α*] (H₂O, 3 h) = +26,8°.

Nach 1 h Erwärmen von VII mit 2 M-HCl kann man im Hydrolysat chromatographisch (Whatman I; Elution: *n*-PrOH—AcOEt—H₂O (Volumenverhältnis = 7 : 1 : 2), Detektion: HIO₄ + Benzidin) die Anwesenheit der D-Glucose (*R_F* = 0,30) und der D-Chinovose (*R_F* = 0,36) feststellen.

Für C₁₂H₂₂O₁₀ (*M_r* = 326,29) *w_i*(berechnet): 44,17 % C, 6,80 % H; *w_i*(gefunden): 44,26 % C, 6,75 % H.

Literatur [2] gibt Schmp. = 242—245 °C (Zersetz.); [*α*] (*λ_D*, 28 °C, H₂O, 5 h) = +25,5° an.

*Methyl-2,2',3,3',4',6-hexa-O-acetyl-
-6'-O-p-toluolsulfonyl-β-cellobiosid (VIII)*

In eine Lösung von 2,5 g Methyl-β-cellobiosid [6] im Pyridin (40 cm³) fügt man 1,5 g *p*-Toluolsulfonylchlorid hinzu und das Reaktionsgemisch läßt man 4 Tage bei Raumtemperatur stehen. Danach wird Acetanhydrid (10 cm³) zugegeben und wieder läßt man das Gemisch 24 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Eingießen ins Wasser (400 cm³) trennt man das ausgeschiedene Produkt ab, das nach Durchwaschen mit Wasser und Abtrocknen aus Äthanol umkristallisiert wird (4,33 g; 86 %). Schmp. = 166 °C; [α] (CHCl₃) = -17,8°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (KBr)/cm⁻¹: 670, 830 (Ph), 900 (β-Glycosid), 1070, 1185 (Acetal), 1225, 1370 (Tosyl), 1435 (CH₃), 1730 (—OAc), 2980 (CH—).

Für C₃₂H₄₂O₁₉S (*M_r* = 762,71) *w_i*(berechnet): 50,39 % C, 5,55 % H, 4,20 % S; *w_i*(gefunden): 50,45 % C, 5,60 % H, 4,10 % S.

Nach Reesterifikation (48 h Stehen im MeOH + 1 % HCl), Methylierung (CH₃I + Ag₂O), alkalischer und nachfolgender saurer Hydrolyse kann man in dem Reaktionsgemisch chromatographisch die Anwesenheit der 2,3,6-Tri-*O*-methyl-D-glucose (*R_{TMG}* = 0,82) und der 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-glucose (*R_{TMG}* = 0,85) (Whatman I; Elution: *n*-BuOH—EtOH—H₂O (Volumenverhältnis 5:1:4); Detektion: Anilin-oxalat) feststellen.

*Methyl-2,2',3,3',4',6-hexa-O-acetyl-
-6'-desoxy-6'-jod-β-cellobiosid (IX)*

Ein Gemisch von 1,75 g VIII, 1,5 g NaI (wasserfrei) und 60 cm³ Aceton verarbeitet man wie bei IV angedeutet ist, womit man ein Produkt (1,57 g; 95 %) mit Schmp. = 179—180 °C (90 % EtOH); [α] (CHCl₃) = -19,3°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (Nujol)/cm⁻¹: 650, 680, 740 (Hal), 895 (β-Glycosid), 1100, 1225 (Acetal), 1370, 1450 (CH₃), 1740 (—OAc) erhält.

Für C₂₅H₃₅IO₁₆ (*M_r* = 718,45) *w_i*(berechnet): 41,79 % C, 4,91 % H, 17,67 % I; *w_i*(gefunden): 41,85 % C, 5,03 % H, 17,58 % I.

*Methyl-2,2',3,3',4',6-hexa-O-acetyl-
-6'-desoxy-β-cellobiosid (X)*

Ein Gemisch von 1,5 g IX, Essigsäureäthylester (100 cm³), Triäthylamin (4 cm³) und 1,5 g Pd/C (*w*(Pd) = 10 %) wird nach Hydrierung (*V*(H₂) ≈ 50 cm³, θ = 20 °C) ähnlich wie beim V verarbeitet, womit man ein Produkt (1,16 g; 93 %) mit Schmp. = 179 °C (96 % EtOH); [α] (CHCl₃) = -21,8°; IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (Nujol)/cm⁻¹: 896 (β-Glycosid), 1065, 1200 (Äther), 1370, 1445 (CH₃), 1740 (—OAc) erhält.

Für C₂₅H₃₆O₁₆ (*M_r* = 592,54) *w_i*(berechnet): 50,67 % C, 6,12 % H; *w_i*(gefunden): 50,72 % C, 6,19 % H.

*1,2,2',3,3',4',6-Hexa-O-acetyl-
-6'-desoxy-α-cellobiose (XI)*

Aus 1,0 g X und 5 cm³ des Acetylierungsgemisches (siehe VI) gewinnt man nach dem, bei IV erwähnten Verfahren ein Produkt (0,68 g; 65 %) mit Schmp. = 185—186 °C

($\text{CHCl}_3 + \text{Petroläther}$); $[\alpha] (\text{CHCl}_3) = +25,3^\circ$; IR: $\bar{\nu}_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 740 (CH—), 820 (α -Glycosid), 1040 (Acetal), 1425 (CH_3), 1750 (—OAc), 2950 (CH—).

Für $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$ ($M_r = 620,55$) $w_i(\text{berechnet})$: 50,32 % C, 5,85 % H; $w_i(\text{gefunden})$: 50,30 % C, 5,94 % H.

6'-Desoxycellobiose (XII)

Nach dem, bei VII erwähnten Verfahren gewinnt man aus 0,6 g XI ein Produkt (0,3 g; 95 %) mit Schmp. = bei 209—210 °C weicht, 237—238 °C (Zersetz.); $[\alpha] (\text{H}_2\text{O}, 3 \text{ h}) = 21,6^\circ$.

Ähnlich wie bei VII, so auch im Hydrolysat von XI kann man chromatographisch die Anwesenheit der D-Glucose und der D-Chinovose feststellen.

Für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ ($M_r = 326,29$) $w_i(\text{berechnet})$: 44,17 % C, 6,80 % H; $w_i(\text{gefunden})$: 44,20 % C, 6,72 % H.

Enzymatische Hydrolyse

Die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse der Cellobiose und ihrer Desoxyderivate ($v_{r,0}$) verfolgte man im 0,05 M-Acetatpuffer (pH = 5,25) (0,3 cm^3) bei 30 °C unter Anwendung der β -Glucosidase aus Süßmandeln (Sewa, Heidelberg, BRD) so wie auch der β -Glucosidase aus *Trichosporon cutaneum* (CC4 30-5-8) [7]. In zugehörigen Zeitintervallen ($t = 0 \rightarrow 45$ min) nimmt man aus dem Reaktionsgemisch aliquote Mustermengen (0,02 cm^3) ab und der Inhalt der D-Glucose resp. D-Desoxyglucose wird mit Glucose-Oxidase- so wie auch mit Peroxidasetest bei Anwendung des 2,2'-Azino-di-(3-äthylbenzthiazolon)-6'-sulfonats [8] festgestellt. Der angegebene Wert v_r bedeutet die relative Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse, extrapolierte für $t = 0$ und bezogene auf die Geschwindigkeit der Cellobiosehydrolyse = 1.

Die Kontrolle des Reaktionsverlaufs wurde auch mittels absteigender Papierchromatographie (Whatman 1; Elution; AcOEt—*iso*PrOH— H_2O (Volumenverhältnis = 6 : 2 : 1), Detektion: AgNO_3) durchgeführt. Die erzielten R_F -Werte sind auf R_F der D-Glucose (R_{Glc}) umgerechnet.

Bei Festlegung der Michaelis-Konstanten (K_m) haben wir die Lösungen der Cellobiose, resp. ihrer Desoxyderivate in 0,001—0,08 mol dm^{-3} Konzentrationen verwendet, wobei unter obenerwähnten Bedingungen die Reaktion 30 min verlief. Ihre Berechnung haben wir mittels „Direct Linear Plot“-Methode [9] durchgeführt.

Literatur

1. Compton, J., *J. Amer. Chem. Soc.* 60, 1203 (1938).
2. Goto, H., Mori, M. und Tejima, S., *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 26, 1926 (1978).
3. Hestrin, S., Feingold, D. S. und Schramm, M., *Methods Enzymol.* 1, 234 (1955).
4. Somogyi, M., *J. Biol. Chem.* 12, 195 (1952).
5. Staněk, J. und Kocourek, J., *Chem. Listy* 47, 697 (1953).

6. Newth, F. H., Nicholas, S. D., Smith, T. und Wiggins, L. F., *J. Chem. Soc.* 1949, 2550.
7. Zemek, J., Augustín, J., Kocková-Kratochvílová, A. und Kuniak, L., *Biológia (Bratislava)* 36, 439 (1981).
8. Bergmeyer, H. V. und Bernt, E., *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Bd. II, S. 1172. Verlag Chemie, Weinheim 1970.
9. Eisenthal, R. und Cornish-Bowden, A., *Biochem. J.* 139, 715 (1974).

Übersetzt von I. Ježo