

Enzymatische Bildung eines Muconsäurederivates mit Hilfe Pyrazon- abbauender Bakterien

Enzymatic Formation of a *cis,cis*-Muconic Acid
Derivative Using Pyrazon-Degrading Bacteria

Friedhelm Blobel, Jürgen Eberspächer,
Siegfried Haug und Franz Lingens

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim

(Z. Naturforsch. **31 c**, 756 [1976]; eingegangen
am 6. September 1976)

Pyrazon, Herbicide, Microbial Degradation, Muconic Acid
Derivative, *ortho*-Cleavage

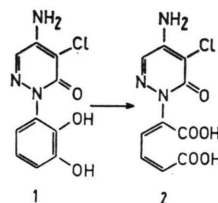
The *cis,cis*-muconic acid derivative of pyrazon, which was formerly isolated from the medium of pyrazon-degrading bacteria, was formed enzymatically by incubation of the catechol derivative of pyrazon with partially purified *ortho* pyrocatechase from pyrazon-degrading bacteria.

Pyrazon [4-Amino-5-chlor-2-phenyl-3 (2H) pyridazinon] ist der herbizide Wirkstoff des Herbizids Pyramin, welches zur Bekämpfung von Samenunkräutern im Zuckerrübenanbau weiteste Verbreitung gefunden hat. Aus Erde konnten Bakterien isoliert werden, die auf Pyrazon als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können¹.

In Rohextrakten Pyrazon-abbauender Bakterien konnten 2 Enzyme nachgewiesen werden, die Brenzkatechin spalten. Eine *ortho*-Pyrocatechase spaltet Brenzkatechin unter Bildung von *cis,cis*-Muconsäure. Eine *meta*-Pyrocatechase führt zur Bildung von α -Hydroxymuconsäuresemialdehyd².

Es konnte angenommen werden, daß die *ortho*-Pyrocatechase auch für die Bildung von 2-(5-Amino-4-chlor-3-oxo-2,3-dihydro-2-pyridazino)-*cis,cis*-muconsäure (2) zuständig ist, die als Akkumulat im Medium Pyrazon-abbauender Bakterien nachgewiesen werden konnte³. Für die Spaltung des Brenzkatechinderivates des Pyrazons⁴ (5-Amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-3 (2H)-pyridazinon (1)

durch die *ortho*-Pyrocatechase mußte dieses Enzym von der erheblich aktiveren *meta*-Pyrocatechase abgetrennt werden. Diese Trennung gelang durch eine Chromatographie des Rohextraktes Pyrazon-abbauender Bakterien an DEAE-Cellulose mit einem linearen Phosphatpuffergradienten pH 7,0 (0,01 – 0,5 M). Die *ortho*-Pyrocatechase wurde zwischen 0,2 und 0,25 M Kaliumphosphat, die *meta*-Pyrocatechase zwischen 0,25 – 0,3 M Kaliumphosphat eluiert. Die *ortho*-Pyrocatechase ist wesentlich instabiler als das *meta*-spaltende Enzym. Versuche, die *ortho*-Pyrocatechase, die innerhalb von 24 Stunden bei 4 °C ihre Aktivität nahezu vollständig verliert, durch Zusatz von Fe²⁺ oder Aceton zu stabilisieren, waren ohne Erfolg. Die *ortho*-Pyrocatechase setzt das Brenzkatechinderivat des Pyrazons (1) mit derselben Geschwindigkeit um wie unsubstituiertes Brenzkatechin. Zu der *ortho*-Pyrocatechase enthaltenden Fraktion wurde das Brenzkatechinderivat des Pyrazons gegeben und 12 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Zugabe des gleichen Volumens Alkohol gefällt und abzentrifugiert. Die gesamte Lösung wurde auf eine Sephadex G 10 Säule aufgetragen. Mit 50-prozentigem Alkohol wurde eluiert. Durch UV-spektroskopische Kontrolle konnten die gesuchten Fraktionen ermittelt werden, die nach Einengen einer präparativen Dünnschichtchromatographie unterworfen wurden. Das hierbei erhaltene Produkt erwies sich nach chemischer Reaktion durch Entfärben von Bromlösung und nach UV- und Massenspektrum als identisch mit der als Akkumulat erhaltenen 2-(5-Amino-4-chlor-3-oxo-2,3-dihydro-2-pyridazino)-*cis,cis*-Muconsäure (2).



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

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der BASF-Limburgerhof für Unterstützung dieser Arbeit.

¹ C. Fröhner, O. Oltmanns u. F. Lingens, Arch. Mikrobiol. **74**, 82–89 [1970].

² R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, Veröffentlichung in Vorbereitung.

³ E. De Frenne, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Biochem. **33**, 357–363 [1973].

⁴ S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, Biochem. Biophys. Res. Commun. **54**, 760–763 [1973].