

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

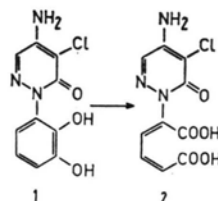
The *cis,cis*-muconic acid derivative of pyrazon, which
was formerly isolated from the medium of pyrazon-de-
grading bacteria, was formed enzymatically by incubation
of the catechol derivative of pyrazon with partially purified
ortho pyrocatechase from pyrazon-degrading bacteria.

Pyrazon [4-Amino-5-chlor-2-phenyl-3(2H) pyri-
dazinon] ist der herbizide Wirkstoff des Herbizids
Pyramin, welches zur Bekämpfung von Samen-
unkräutern im Zuckerrübenanbau weiteste Verbrei-
tung gefunden hat. Aus Erde konnten Bakterien iso-
liert werden, die auf Pyrazon als einziger Kohlen-
stoffquelle wachsen können¹.

In Rohextrakten Pyrazon-abbauender Bakterien
konnten 2 Enzyme nachgewiesen werden, die Brenz-
katechin 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*-mu-
consäure (2) zuständig ist, die als Akkumulat im
Medium Pyrazon-abbauender Bakterien nachgewie-
sen werden konnte³. Für die Spaltung des Brenz-
katechinderivates 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 ab-
getrennt werden. Diese Trennung gelang durch eine
Chromatographie des Rohextraktes Pyrazon-abbau-
ender Bakterien an DEAE-Cellulose mit einem line-
aren 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*-Pyro-
catechase, die innerhalb von 24 Stunden bei 4 °C
ihre Aktivität nahezu vollständig verliert, durch Zu-
satz von Fe²⁺ oder Aceton zu stabilisieren, waren
ohne Erfolg. Die *ortho*-Pyrocatechase setzt das
Brenzkatechinderivat des Pyrazons (1) mit dersel-
ben Geschwindigkeit um wie unsubstituiertes Brenz-
katechin. Zu der *ortho*-Pyrocatechase enthaltenden
Fraktion wurde das Brenzkatechinderivat des Pyra-
zons gegeben und 12 Stunden bei 30 °C inkubiert.
Anschließend wurde das Protein durch Zugabe des
gleichen Volumens Alkohol gefällt und abzentrifu-
giert. Die gesamte Lösung wurde auf eine Sephadex
G 10 Säule aufgetragen. Mit 50-prozentigem Alko-
hol wurde eluiert. Durch UV-spektroskopische Kon-
trolle konnten die gesuchten Fraktionen ermittelt
werden, die nach Einengen einer präparativen Dün-
nschichtchromatographie unterworfen wurden. Das
hierbei erhaltene Produkt erwies sich nach chemi-
scher 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*-Mucon-
säure (2).



Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Lingens, Uni-
versität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie, Garben-
str. 30, D-7000 Stuttgart 70.

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

² R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, Ver-
öffentlichung in Vorbereitung.

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

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

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



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 digitalized 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.