

Enzymatische Bildung von 2-Keto-4-hydroxyvaleriansäure mit Hilfe von Pyrazon-abbauenden Bakterien

Enzymatic Formation of 4-Hydroxy-2-Oxovalerate
Using Pyrazon-Degrading Bacteria

Friedhelm Blobel, Jürgen Eberspächer
und Franz Lingens

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim

(Z. Naturforsch. **31 c**, 757 [1976]; eingegangen
am 6. September 1976)

Pyrazon, Herbicide, Microbial Degradation, Degradative
Pathway

By treatment of 2-hydroxymuconic acid with a partially
purified 4-oxalocrotonate decarboxylase 4-hydroxy-2-oxo-
valerate could be obtained. Both forms of 4-hydroxy-2-oxo-
valerate, the keto as well as the enol form could be isolated.

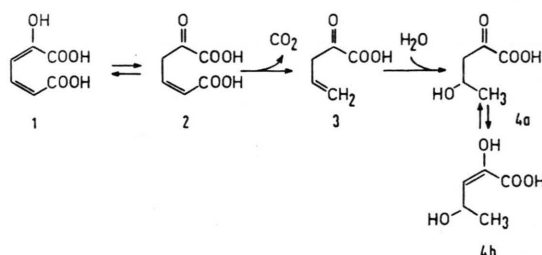
Bei der Untersuchung über den Abbau des Herbi-
zids Pyrazon durch Bodenbakterien konnten wir
feststellen, daß ein Rohextrakt dieser Bakterien
2-Hydroxymuconsäure (**1**) unter stöchiometrischer
Bildung von CO₂ metabolisiert¹. Dabei war aber
nicht festgestellt worden, welche Carboxylgruppe ab-
gespalten wird und welches Produkt entsteht. Es
wurde versucht, diese Frage auf enzymatischem
Wege zu klären. Dazu wurde ein Enzym angerei-
chert, welches die Fähigkeit besitzt, 2-Hydroxy-
muconsäure (**1**) bzw. deren tautomere Form 4-
Oxalocrotonsäure (**2**) umzusetzen. Dieses Enzym
ist im Rohextrakt von Pyrazon-abbauenden Bakte-
rien gut nachweisbar, und es läßt sich durch Chro-
matographie an DEAE-Cellulose anreichern.

Das Enzym, die 4-Oxalocrotonatdecarboxylase,
besitzt ein Temperaturoptimum von 40 °C und ein
pH-Optimum von 7,0 in 0,4 M Tris-Puffer. 2-Hy-
droxymuconsäure (**1**) wurde mit dem angereicherten
Enzym 23 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die In-
kubation wurde durch Zugabe von 50-prozentiger
Trichloressigsäure beendet. Nach Einengen auf die
Hälfte wurde die Lösung auf eine Säule mit Amber-
lite IRA 400 gegeben. Bei der Elution mit Essig-
säure und Salzsäure traten zwei Fraktionen auf, die

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

¹ E. De Frenne, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Bio-
chem. **33**, 357–363 [1973].

beide mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagierten.
Die Fraktionen wurden jede für sich weiter aufge-
arbeitet. Die Proben wurden am Rotationsverdamp-
fer eingengt und aus Acetonitril umkristallisiert.
Nach intensiver Trocknung wurden von beiden Pro-
ben NMR-Spektren angefertigt. Daraus läßt sich ab-
leiten, daß die eine Probe 2-Keto-4-hydroxyvalerian-
säure (**4a**), während die andere die tautomere
Enolform (**4b**) darstellt. **4a** zeigt ein Dublett bei
1,28 ppm (endständige CH₃-Gruppe), ein Dublett
bei 2,5 ppm (CH₂-Gruppe am C-Atom 3) und ein
Quartett bei 4,2 ppm (CHOH-Gruppe). **4b** zeigt
ein Dublett bei 6,26 ppm (olefinisches Proton am
C-Atom 3), ein Quartett bei 5,0 ppm (CHOH-
Gruppe) und ein Dublett bei 1,4 ppm (endständige
CH₃-Gruppe).



Es wird also die der OH-Gruppe entferntere
Carboxylgruppe der 2-Hydroxymuconsäure nach
Umlagerung zur 4-Oxalocrotonsäure (**2**) abgespal-
ten. Die Umlagerung von der Enolform (**1**) in die
Ketoform (**2**) erfolgt in Phosphatpuffer spontan.
Es konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von
Enzymrohextrakt aus Pyrazon-abbauenden Bakte-
rien diese Tautomerisierung wesentlich beschleunigt
wird, was dafür spricht, daß der Extrakt eine Tauto-
merase enthält. Die bei der CO₂-Abspaltung zu-
nächst gebildete 2-Keto-4-en-valeriansäure (**3**)
lagert in einer spontanen Reaktion sofort Wasser
an, wobei 2-Keto-4-hydroxy-valeriansäure gebildet
wird. Diese Art der Decarboxylierung wurde erst-
mals von Sala-Trepát und Evans bei einer *Azoto-
bacter* Species beobachtet².

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem
Fonds der Chemischen Industrie und der BASF-Limburger-
hof für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken Herrn
Dr. P. Fischer (Universität Stuttgart) für die Anfertigung
und Interpretation der NMR-Spektren.

² J. M. Sala-Trepát u. W. C. Evans, Eur. J. Biochem. **20**,
400–413 [1971].



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.