

## 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. **31c**, 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-oxovalerate could be obtained. Both forms of 4-hydroxy-2-oxovalerate, the keto as well as the enol form could be isolated.

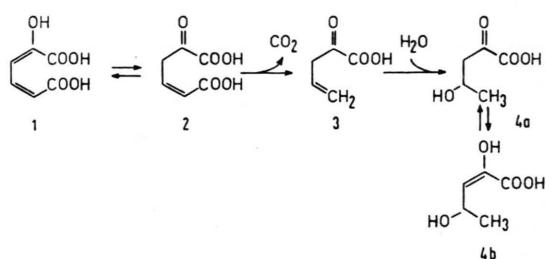
Bei der Untersuchung über den Abbau des Herbizids Pyrazon durch Bodenbakterien konnten wir feststellen, daß ein Rohextrakt dieser Bakterien 2-Hydroxymuconsäure (**1**) unter stöchiometrischer Bildung von  $\text{CO}_2$  metabolisiert<sup>1</sup>. Dabei war aber nicht festgestellt worden, welche Carboxylgruppe abgespalten wird und welches Produkt entsteht. Es wurde versucht, diese Frage auf enzymatischem Wege zu klären. Dazu wurde ein Enzym angereichert, welches die Fähigkeit besitzt, 2-Hydroxymuconsäure (**1**) bzw. deren tautomere Form 4-Oxalocrotonsäure (**2**) umzusetzen. Dieses Enzym ist im Rohextrakt von Pyrazon-abbauenden Bakterien gut nachweisbar, und es läßt sich durch Chromatographie an DEAE-Cellulose anreichern.

Das Enzym, die 4-Oxalocrotonatdecarboxylase, besitzt ein Temperatuoptimum von  $40^\circ\text{C}$  und ein pH-Optimum von 7,0 in 0,4 M Tris-Puffer. 2-Hydroxymuconsäure (**1**) wurde mit dem angereicherten Enzym 23 Stunden bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 50-prozentiger Trichloressigsäure beendet. Nach Einengen auf die Hälfte wurde die Lösung auf eine Säule mit Amberlite IRA 400 gegeben. Bei der Elution mit Essigsäure und Salzsäure traten zwei Fraktionen auf, die

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

<sup>1</sup> E. De Frenne, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Biochem. **33**, 357–363 [1973].

beide mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagierten. Die Fraktionen wurden jede für sich weiter aufgearbeitet. Die Proben wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und aus Acetonitril umkristallisiert. Nach intensiver Trocknung wurden von beiden Proben NMR-Spektren angefertigt. Daraus läßt sich ableiten, daß die eine Probe 2-Keto-4-hydroxyvaleriansäure (**4a**), während die andere die tautomere Enolform (**4b**) darstellt. **4a** zeigt ein Dublett bei 1,28 ppm (endständige  $\text{CH}_3$ -Gruppe), ein Dublett bei 2,5 ppm ( $\text{CH}_2$ -Gruppe am C-Atom 3) und ein Quartett bei 4,2 ppm ( $\text{CHOH}$ -Gruppe). **4b** zeigt ein Dublett bei 6,26 ppm (olefinisches Proton am C-Atom 3), ein Quartett bei 5,0 ppm ( $\text{CHOH}$ -Gruppe) und ein Dublett bei 1,4 ppm (endständige  $\text{CH}_3$ -Gruppe).



Es wird also die der OH-Gruppe entferntere Carboxylgruppe der 2-Hydroxymuconsäure nach Umlagerung zur 4-Oxalocrotonsäure (**2**) abgespalten. 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 Bakterien diese Tautomerisierung wesentlich beschleunigt wird, was dafür spricht, daß der Extrakt eine Tautomerase enthält. Die bei der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zunächst 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 erstmals von Sala-Trepaut und Evans bei einer *Azotobacter* Species beobachtet<sup>2</sup>.

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

<sup>2</sup> J. M. Sala-Trepaut u. W. C. Evans, Eur. J. Biochem. **20**, 400–413 [1971].

