

Enzymatische Bildung und Isolierung von 2-Hydroxymuconsäure, ein Metabolit im bakteriellen Abbau des Herbizids Chloridazon

Enzymatic Formation and Isolation of 2-Hydroxymuconic Acid, a Metabolite in the Bacterial Degradation of the Herbicide Chloridazon

Rudolf Müller und Franz Lingens

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70

Z. Naturforsch. **35 c**, 346–347 (1980);
eingegangen am 17. Dezember 1979

Chloridazon, Herbicide, Microbial Degradation, 2-Hydroxymuconic Acid, *meta*-Cleavage

2-Hydroxymuconic acid, formerly postulated as an intermediate of the bacterial degradation of chloridazon (5-amino-4-chlor-2-phenyl-2H-pyridazin-3-on), could be isolated after incubation of 5-amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-2H-pyridazin-3-on (**1**) with purified metapyrocatechase and enriched amidase from chloridazon-degrading bacteria by reversed phase high performance liquid chromatography.

Bei der Untersuchung des mikrobiellen Abbauges des Herbizids Chloridazon (5-Amino-4-chlor-2-phenyl-2H-pyridazin-3-on) wurde schon frühzeitig 2-Hydroxymuconsäure als Zwischenprodukt postuliert [1]. Trotz genauer enzymatischer Untersuchung der einzelnen Schritte des Abbauges [2–6] konnte 2-Hydroxymuconsäure nicht nachgewiesen werden. Setzt man 5-Amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-2H-pyridazin-3-on (**1**) mit Metapyrocatechase um, so entsteht zunächst, durch eine intensiv gelbe Farbe erkennbar, Verbindung **2**. Diese zerfällt spontan in die Verbindungen **3** und **4**. Diese Verbindungen können von Chloridazon verwertenden Bakterien nicht weiter umgesetzt werden. Gibt man zu dem Ansatz eine aus Chloridazon abbauenden Bakterien angereicherte Amidase, so verringert sich die Menge an gebildetem Lacton (**4**), und freie 2-Hydroxymuconsäure (**5**) wird gebildet. Diese kann von Chloridazon abbauenden Bakterien weiter verwendet werden [6]. Der Nachweis der freien 2-Hydroxymuconsäure scheiterte bisher an der Tatsache, daß sie von ihrem δ -Lacton unter Bedingungen abgetrennt werden muß, bei denen sowohl die Umwandlung vom Lacton in die freie

Säure als auch die Rückreaktion ausgeschlossen sind. Diese Trennung und damit der Nachweis von 2-Hydroxymuconsäure im mikrobiellen Abbau von Chloridazon gelang jetzt mit Hilfe der reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

Dünnschichtchromatographie: Zur Dünnschichtchromatographie wurden Fertigfolien von Macherey-Nagel (Kieselgel Typ G mit Fluoreszenzindikator) verwendet. Als Laufmittel dienten: Benzol/Dioxan/Eisessig (90/25/4) und Ethanol/Chloroform/Ammoniak/Wasser (60/30/30/5).

Geräte: UV-Spektren wurden mit einem Spektralphotometer DMR 21 der Firma Zeiss aufgenommen. Zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie diente ein Gerät der Firma Knauer mit einer Fertigsäule, gefüllt mit silanisiertem Kieselgel (RP8) ($0,8 \times 25$ cm). Die Elution der Substanzen wurde mittels eines UV-Detektors mit einem Flachsreiber der Firma Linseis bestimmt.

Enzymansätze: Ansatz a: 500 μ l 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 + 100 μ l gereinigte Metapyrocatechase [4] (1 mg/ml) + 10 μ l 5×10^{-3} M $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung wurden gemischt. Dazu wurden mit einer Schlauchpumpe unter kräftigem Rühren 500 μ l 10^{-3} M-Lösung von Verbindung **1** innerhalb von einer Stunde zudosiert.

Ansatz b: 500 μ l angereicherte Amidase [4, 7] + 100 μ l gereinigte Metapyrocatechase [4] + 100 μ l

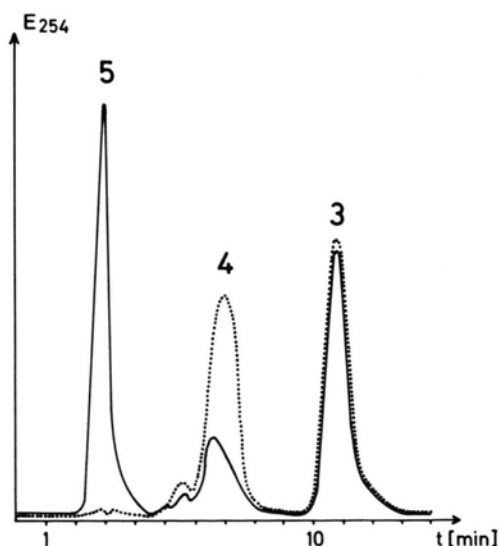


Abb. 1. Hochleistungsflüssigkeitschromatogramm nach der Umsetzung von Verbindung **1**. a) ohne Amidase; b) — mit Amidase.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Lingens.
0341-0382/80/0300-0346 \$ 01.00/0



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.

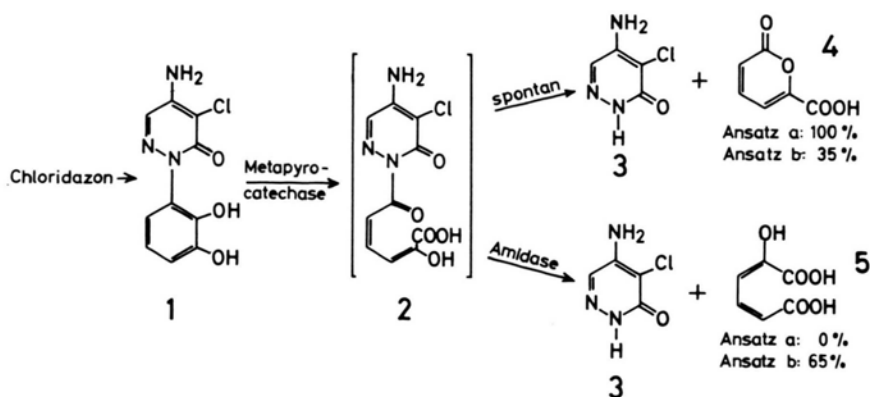


Abb. 2. Abbau von 5-Amino-4-chlor-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-2H-pyridazin-3-on.

5×10^{-3} M $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung wurden gemischt. Dazu wurde wie in Ansatz a das Substrat gegeben.

Anschließend wurden beide Ansätze 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert. Je 1 ml des Überstandes wurde auf eine reversed-phase (RP-8) Kieselgelsäule ($0,8 \times 25$ cm) gegeben und mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 mit 3 ml/min eluiert. Die erhaltenen Peaks wurden aufgefangen und UV-spektroskopisch und dünnschichtchromatographisch untersucht. Außerdem wurde von jeder zu erwartenden Substanz die Retentionszeit mit synthetisierten Vergleichssubstanzen bestimmt.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, ergaben sich beim Ansatz a 2 Peaks (3 und 4). Die Retentionszeiten, die R_F -Werte in der Dünnschichtchromatographie und die spektroskopischen Befunde stimmten mit denen von Verbindung 3 und 4 (s. Abb. 2) überein. Im Ansatz b erschien zusätzlich zu diesen Peaks noch ein dritter, sehr intensiver Peak (5), dessen Reten-

tionszeit (170 Sekunden) mit der von 2-Hydroxymuconsäure übereinstimmte. Durch Zugabe synthetischer 2-Hydroxymuconsäure vergrößerte sich dieser Peak. Auch das dünnschichtchromatographische Verhalten in allen verwendeten Laufmitteln stimmte mit synthetischer 2-Hydroxymuconsäure überein, ebenso wie das UV-Spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 305$ nm) mit der Alkaliverschiebung auf 345 nm. Aus den Peakintensitäten läßt sich berechnen, daß im Ansatz a Verbindung 1 vollständig in die Verbindungen 3 und 4 umgesetzt wurde, während im Ansatz b durch den Zusatz der Amidase 65% in Verbindung 5 und nur 35% in Verbindung 4 umgewandelt wurden. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen [4] sehr gut überein. In Abb. 2 sind die Verhältnisse zusammenfassend dargestellt.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung unserer Arbeiten.

- [1] E. De Frenne, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Biochem. **33**, 357–363 (1973).
- [2] K. Sauber, C. Fröhner, G. Rosenberg, J. Eberspächer u. F. Lingens, Eur. J. Biochem. **74**, 89–97 (1977).
- [3] J. Eberspächer u. F. Lingens, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 1323–1336 (1978).
- [4] R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer u. F. Lingens, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 797–805 (1977).

- [5] F. Blobel, J. Eberspächer, S. Haug u. F. Lingens, Z. Naturforsch. **31 c**, 756 (1976).
- [6] F. Blobel, J. Eberspächer u. F. Lingens, Z. Naturforsch. **31 c**, 757 (1976).
- [7] R. Müller u. F. Lingens, Liebigs Ann. Chem. **1978**, 1734–1738.