

U/312

Ivojlov, V.S., Karasević, Ju.N., Surovceva, È.G.

BESONDERHEITEN DER TRANSFORMATION UND VERWERTUNG VON  
4-FLUORBENZOESÄURE DURCH *Corynebacterium fascians*

Deutsche Vollübersetzung aus:

Mikrobiologija. Moskva, 56 (1987), Nr 2, S. 199 - 204.

Russ.: **ОСОБЕННОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ И УТИЛИЗАЦИИ  
4-ФТОРБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ *CORYNEBACTERIUM  
FASCIANS***

Osobennosti transformacii i utilizacii 4-ftorbenzoičnoj  
kisloty *Corynebacterium fascians*

*Corynebacterium fascians* INMI KIS-1 cannot utilise 4-fluorobenzoic acid since one of the enzyme activities is absent at the terminal steps of 4-FBA preparatory metabolism. Up to 95% of the fluoride is split off in the course of 4-FBA transformation. The quantity of 4-carboxymethylene butenolide and maleylacetate accumulated in the medium in the process of 4-FBA transformation by *C. fascians* INMI KIS-1 corresponds, in stoichiometrical terms, to the amount of added 4-FBA. This value is far lower (26%) in a *C. fascians* INMI KIS-9 mutant capable of 4-FBA utilization.

Therefore, *C. fascians* adaptation to 4-FBA should be attributed to the fact that one of the enzyme activities at the terminal steps of 4-FBA preparatory metabolism (maleylacetate reductase) either appears or noticeably rises.

Die Anfangsreaktionen des Umsatzes von Fluorbenzoesäuren durch Bakterien werden in der Regel durch Enzyme des Benzoesäure-Metabolismus katalysiert (BS) /9, 12/. Fluorbenzoesäuren (FBS) sind gewöhnlich auch Indikatoren für eine Biosynthese dieser Enzyme /8, 10/. Diese Fakten lassen sich durch die Ähnlichkeit der Abmessungen der Wasserstoff- und Fluor-Atome erklären, d.h. durch die Ähnlichkeit in der Struktur der BS und der Fluorbenzoesäuren /11/. Man dürfte

deshalb erwarten, daß BS-verwertungsfähige Mikroorganismen auch Fluorbenzoesäuren verwerten. Festgestellt wurde jedoch, daß solche Mikroorganismen zu mehr oder weniger vollständigen Transformation fähig sind, jedoch nicht zur Verwertung der Fluorbenzoesäuren /6, 10/. Dies wurde auf die Ansammlung von toxischen Verbindungen während der Transformation der Fluorbenzoesäuren zurückgeführt, was zur Inaktivierung einzelner Enzyme führt /7, 16/.

Gleichzeitig haben wir Informationen, daß man über Anreicherungskulturen oder durch experimentelles Adaptieren Stämme von Mikroorganismen erzeugen kann, die die einen oder anderen Fluorbenzoesäuren verwerten /3, 9, 13/. Um die direkten Ursachen für das Auftreten solcher Mikroorganismen in der Natur herauszufinden, muß der Wissenschaftler neben dem adaptierten Stamm auch den ursprünglichen Stamm besitzen, der die unnatürlichen Verbindungen nicht verwerten kann.

Im vorliegenden Bericht werden die Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung der Besonderheiten bei der Transformation von 4-Fluorbenzoesäure (4-FBS) durch den ursprünglichen Stamm *Corynebacterium fascians* INMI KIS-1 und die Mutante *C. fascians* INMI KIS-9 mitgeteilt. Die Mutante ist gegenüber 4-FBS verwertungsfähig, gegenüber BS jedoch nicht mehr /1/.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der Ursachen für das ausbleibende Wachstum des ursprünglichen Stammes in einem Medium mit 4-FBS.

### Gegenstand und Verfahren der Untersuchung

Die Abtrennung des ursprünglichen (INMI KIS-1) und des adaptierten Stammes (INMI KIS-9) von *C. fascians*, die Zusammensetzung des Mediums und die Kultivierungsbedingungen sind bereits beschrieben /1/.

Zur Oxidation von 4-FBS bei Umsatzversuchen mit Ruhezellen des ursprünglichen und des adaptierten Stammes und zur Ausscheidung der Zwischenprodukte des Katabolismus wurden Zellen benutzt, die in einem Medium mit 0,05 % BS oder 0,2 % Bernsteinsäure als Kohlenstoffquelle gezüchtet wurden. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, mit 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (pH-Wert 7,1) gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Der Zellengehalt betrug 1 - 4 mg/ml (umgerechnet auf trockene Biomasse). Der Zellsuspension wurde das aromatische Untersuchungssubstrat zugegeben und es wurde in Erlenmeyer-Kolben aerob (im Schüttelapparat) bei 28° inkubiert.

Die 4-FBS-Transformationsprodukte wurden nach dem Entfernen der Zellen und nach dem Ansäuern mit 1 N  $\text{HClO}_4$  auf pH 2 - 2,2 durch peroxidfreien Schwefeläther kalt extrahiert ( $0 - 2^\circ$ ). Die Ätherextrakte wurden mit wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, auf ein geringes Volumen vakuumverdampft und spektrometrisch sowie chromatographisch analysiert.

Die Dünnschichtchromatographie der Metaboliten wurde an "Silu-  
fol UF-254"-Platten ("Kavalier", ČSSR) durchgeführt, und zwar an den Systemen: a) Chloroform - Essigsäure (4:1); b) Chloroform - Äthylacetat - Ameisensäure (100:20:5). Zum Entwickeln wurde diazotierte Sulfanilsäure (0,5 %ige Lösung in 10 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 3 %ige Bromkresolgrünlösung in 80 %igem Methanol (für die Säuren), Kaliumpermanganat und UV-Licht (für die ungesättigten Verbindungen), 1%ige Nitroprussidnatriumlösung in 1 N NaOH in 50 %igem Äthanol (für die Lactone) benutzt.

BS und 4-FBS wurden je nach Veränderung der Extinktion bei  $\lambda_{\text{max}}$  bestimmt, wobei der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  gleich 8650 bei BS und gleich 8110 bei 4-FBS war. Die UV-Spektren der Verbindungen wurden am Spektrophotometer "Spekord M40" (DDR) aufgenommen.

4-Fluorbrenzkatechin (4-FBK) als Zwischenprodukt des Katabolismus der 4-FBS wurde bei einer von uns gewonnenen Mutante von *C. fascians* festgestellt, die in der Brenzkatechin-Dioxygenase defekt war, jedoch weiter fähig blieb zu induzierter Synthese der BS-Dioxygenase. Die Kulturen wurden auf einem Medium mit 0,2 % Bernsteinsäure gezüchtet, Zellsuspensionen wurden hergestellt (siehe oben) und unter geeigneten Bedingungen mit 0,025 % 4-FBS inkubiert. Das 4-FBS-Oxidationsprodukt wurde nach dem Entfernen der Zellen durch Diäthyläther bei neutralem pH-Wert extrahiert. Der Ätherextrakt wurde mit wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, bis auf ein geringes Volumen eingedampft, und das Eluat wurde analysiert. Das abgeschiedene 4-FBK war chromatographisch rein ( $\lambda_{\text{max}}=282$  nm; Äther),  $R_f$  im System "a" - 0.6 und im System "b" - 0.44.

4-Carboxymethylenbutenolid wurde nach präparativer Trennung auf den "Siluphol"-Platten durch das Absorptionsspektrum in UV und durch den Übergang in Maleylessigsäure bei Laugebehandlung identifiziert (KOH, pH 13) /14/.

Zur Gewinnung einer Referenz der Maleylessigsäure wurde ein Hefeextrakt von *Candida tropicalis* SD5 hergestellt, gezüchtet auf einem Medium mit Hydrochinon. Dieser Extrakt enthielt eine aktive Dioxygenase, die die Intradiolspaltung des Oxyhydrochinons unter Bildung von Maleylessigsäure in stöchiometrischen Mengen katalysierte /2/. Das Reaktionsgemisch mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,1, 2 mM Oxyhydrochinon (durch Sublimation vakuumgereinigt) und Extrakt der Hefe (0,5 - 1,0 mg Protein/ml Reaktionsgemisch) wurde aerob bei  $28^\circ$  C inkubiert. Während der Reaktion wurde die Zunahme der Extinktion bei 243 nm beobachtet. Bei Abschluß der Reaktion wurde das Protein durch Ansäuern mit 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf pH 2,0 (kalt) ausgefällt. Maleyl-

acetat ist eine äußerst instabile Verbindung. In wässrigen Lösungen zersetzt sie sich stark innerhalb einiger Tage auch bei 2 - 4°. Die Extraktion durch Diäthyläther bei Zimmertemperatur oder durch einen ungenügend peroxidfreien Äther führt zu vollständiger Zersetzung des Maleylacetats. Deshalb wurden bei der Trennung die genannten Bedingungen beachtet.

3-Ketoadipinsäure wurde chromatographisch und in Reaktion mit Nitroprussid bestimmt (Rotera-Test).

Die Enzymaktivitäten, die die genannten Schritte des 4-FBS-Abbaus katalysieren, wurden in zellfreien Extrakten von *C. fascians* nach Zerstörung der Zellen im Ultraschalldesintegrator MSE 100W (England) bestimmt. Der Proteingehalt in den Extrakten wurde mit der Biuret-Methode bestimmt.

Die O<sub>2</sub>-Absorption bei 4-FBS-Oxidation durch die Zellen wurde im Warburg-Thermostat gemessen.

Zur Bestimmung der Fluor-Ionen wurden die Ionenselektions-elektrode EF-6 (UdSSR) und der Ionenmesser OR-264/1 (Ungarn) benutzt.

### Versuchsergebnisse und Auswertung

Festgestellt wurde, daß *C. fascians* INMI KIS-1 4-FBS in Konzentrationen von 0,02 - 0,05 % nicht als Kohlenstoffquelle benutzt. Eine Inokulierung mit 10<sup>8</sup> Zellen/ml (0,05 mg Trockenbiomasse) führt nur zu einer unwesentlichen 4-FBS-Konzentrationsabnahme ohne Biomassenzunahme. Bei Züchtung der Zellen auf einem Substratgemisch (0,05 % BS + 0,05 % 4-FBS) wurde völliges Verschwinden der BS und Umwandlung der 4-FBS in nichtfluorhaltige Produkte beobachtet. Die Fluoridfreisetzung betrug mindestens 95 %. Jedoch konnten wir keine starke Zunahme der Biomasse beim Kultivieren auf dem Substratgemisch gegenüber dem Wachstum auf BS als einziger Kohlenstoffquelle feststellen (0,24 mg Trockenbiomasse/ml beim Substratgemisch in den genannten Konzentrationen gegenüber 0,25 mg bei 0,05 % BS). Bei Aufzucht auf einem Gemisch aus Bernsteinsäure (0,1 %) und 4-FBS (0,05 %) wurden folgende Ergebnisse erzielt: 0,37 mg Trockenbiomasse/ml auf dem Substratgemisch und 0,38 mg/ml auf 0,1 % Bernsteinsäure.

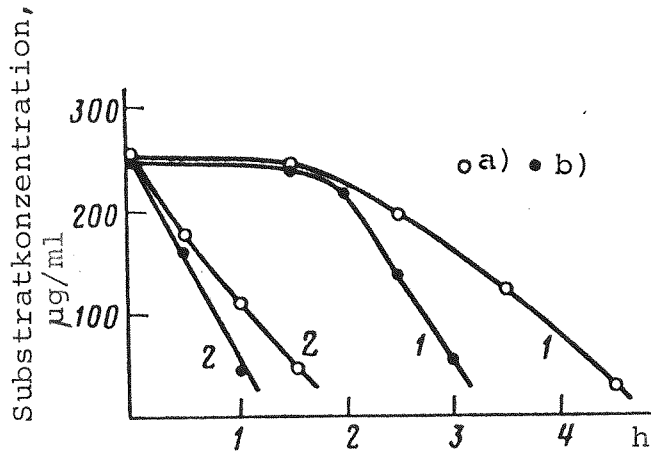


Abb. 1. Kinetik der BS- und 4-FBS-Umwandlung durch nichtinduzierte Zellen von *C. fascians* (1) und durch Zellen, die auf BS gezüchtet wurden (2). Die Zellen wurden in einem Medium mit 0,2 % Bernsteinsäure bzw. 0,05 % BS gezüchtet, gewaschen und in Phosphatpuffer suspendiert. Die Zellkonzentration betrug 4 mg/ml (1) und 1,2 mg/ml (2) je nach Gewicht der Trockenbiomasse.

a) 4-FBS; b) BS.

Ausführungen zum Katabolismus bei *C. fascians* INMI KIS-1 sind in /1/ enthalten. Das System der oxidativen BS-Umwandlung ist induzierbar, wobei die Induktion sowohl in Gegenwart von BS als auch von 4-FBS festzustellen ist. Die in einem Medium mit BS gezüchteten Zellen oxidierten auch 4-FBS schnell, wobei die Aktivität des Dioxygenasesystems der BS gegenüber beiden Substraten wesentlich größer war als beim Induzieren der BS- oder 4-FBS-Zellen. Mehrmaliges Zugeben von 4-FBS führt zu einem starken Abfall der Benzoatoxidationsaktivität der Zellen, wohingegen die Aktivität der Zellen bei Zugabe von BS konstant bleibt. Auch führt ein Zugeben von 4-FBS in ein Medium mit Zellen des adaptierten Stammes (INMI KIS-9) nicht zu einer Veränderung der Oxidationsgeschwindigkeit des aromatischen Substrats (Tab. 1). Die schnelle Abnahme der Oxidationsgeschwindigkeit von 4-FBS bei wiederholter Zugabe an die Zellen des ursprünglichen Stammes kann eine Folge der Labilität des BS-Dioxygenasesystems sein, deren Höhe und Aktivität von einer konstanten Zufuhr an Energie und Aufbaustoffen abhängt. Offensichtlich vollzieht sich die 4-FBS-Transformation durch Bildung eines oder mehrerer Zwischenprodukte des Abbaus, die

nicht Bestandteile des zentralen Metabolismus sind und die der Zelle nicht den notwendigen Kohlenstoff- und Energiebedarf für ein Funktionieren des induzierbaren BS-Dioxygenasesystems liefern.

T a b e l l e 1

Abhängigkeit der BS- und 4-FBS-Transformationsgeschwindigkeit von wiederholten Substratzugaben an die Zellsuspensionen

Anzahl der Substratzugaben	Transformationsgeschw. d. Substrats, $\mu\text{g/h}\cdot\text{mg}$ Trockenbiomasse		
	ursprünglicher Stamm	adaptierter	
	Substrat		
	BS	4-FBS	4-FBS
1	41 (nach Induktion)	23 (nach Induktion)	25 (nach Induktion)
2	46	14	27
3	51	9	nicht gemessen
4	46	2	24

Anmerkung: Die Zellen wurden in einem Medium mit 0,2 % Bernsteinsäure als Kohlenstoffquelle gezüchtet. Vorbereitung der Zellsuspensionen und Inkubationsbedingungen sind im Abschnitt "Verfahren" beschrieben. Das Substrat wurde in Portionen von 0,25 mg/ml dem Inkubationsgemisch zugegeben. Nach Aufbrauchen des Substrats wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit Phosphatpuffer gewaschen und in dem gleichen Puffer mit einer neuen Substratportion resuspendiert.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Unfähigkeit zur Verwertung der 4-FBS ist das Fehlen von einem oder mehreren Enzymen des 4-FBS-Katabolismus im ursprünglichen Stamm und als Folge dessen eine Anhäufung von entsprechenden Zwischenprodukten in der Kulturflüssigkeit. Zur Überprüfung dieser Annahme entschlossen wir uns zu Umsatzversuchen mit Ruhezellen, da der ursprüngliche und der adaptierte Stamm unter physiologischen Bedingungen aufgrund ausbleibenden Wachstums des ursprünglichen Stammes mit der 4-FBS nicht zu vergleichen waren. In Abb. 2 sind die Daten zur 4-FBS-Abnahme und zur An-

häufung der Transformationsprodukte dargestellt. Vor allem ist auf die Tatsache einer ausreichend vollständigen 4-FBS-Degrada-

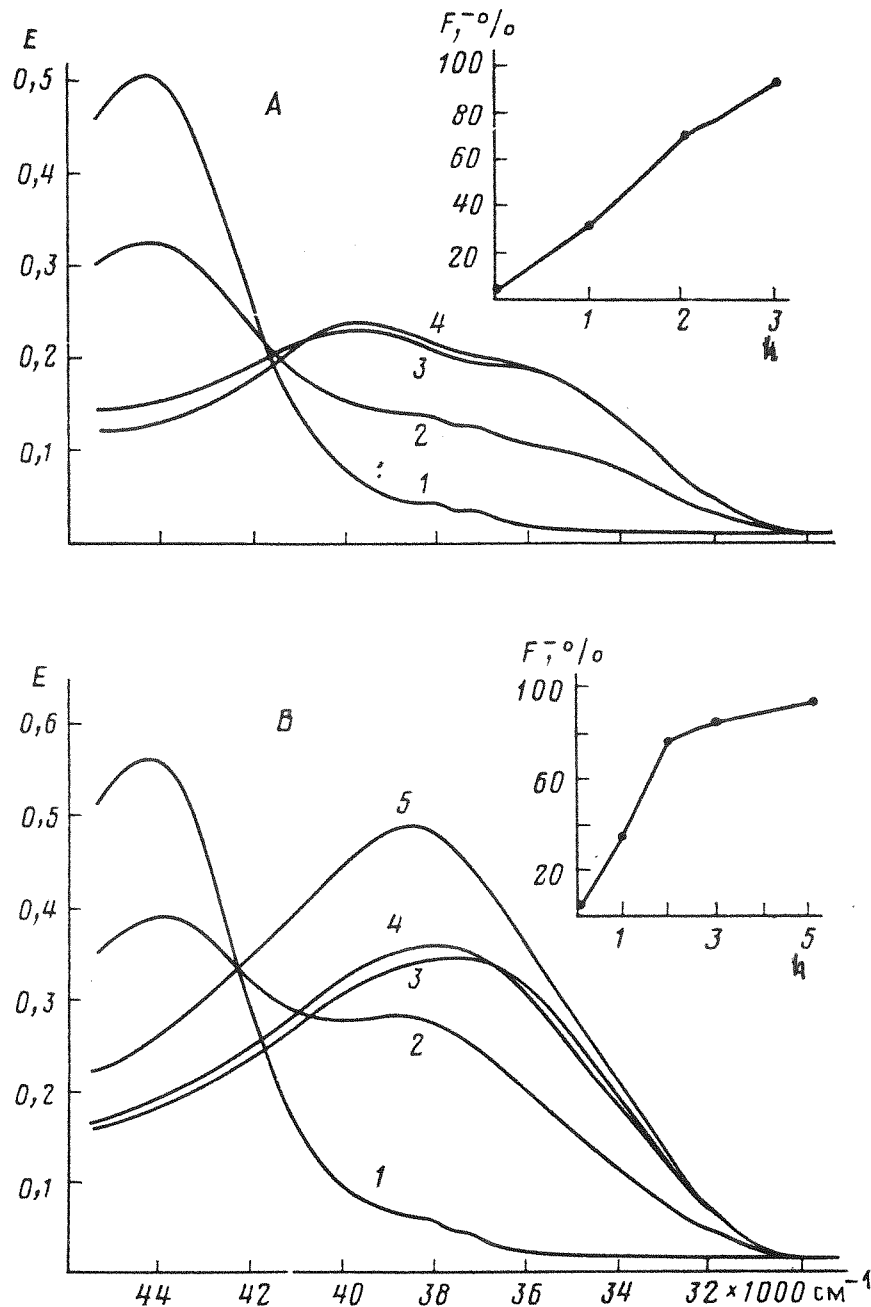


Abb. 2. 4-FBS-Transformation durch die Zellen des ursprünglichen (A) und des adaptierten Stammes (B) von *C. fascians* im Umsatzversuch mit Ruhezellen. Die Stämme wurden auf einem Medium mit 0,2 % Bernsteinsäure gezüchtet und 18 h lang mit 2,5 mM 4-FBS in Phosphatpuffer induziert. Die Zellen wurden in Puffer mit 2,45 mM (bei A) und 2,65 mM (bei B) 4-FBS resuspendiert und bei 28° aerob inkubiert: A: 1) 0 h, 2) 1, 3) 2, 4) 4 h. B: 1) 0 h, 2) 1, 3) 5, 4) 3, 5) 2 h.

tion durch beide Stämme hinzuweisen, begleitet von einer praktisch vollständigen Abspaltung der Fluorionen. Es wurden jedoch Unterschiede festgestellt und bestimmt. Chromatographisch und spektrophotometrisch wurde festgestellt, daß bei Umsatzversuchen mit Ruhezellen Maleyllessigsäure und 4-Carboxymethylenbutenolid Endprodukte der 4-FBS-Transformation durch die Zellen des ursprünglichen Stammes sind. Letztgenannte Verbindung stellt das Hauptprodukt der 4-FBS-Transformation durch die Zellen des adaptierten Stammes dar. Zur Bestimmung der Menge der Ausscheidungsprodukte wurden Extrakte von *Pseudomonas diminuta* INMI KIS-7 verwendet /4/. Die Zellen dieses Organismus, gezüchtet auf 4-Chloranilin, enthalten aktive Transformationsenzyme von 4-Carboxymethylenbutenolid in Maleylacetat und von Maleylacetat in 3-Ketoadipinsäure. Die Kulturflüssigkeit aus dem Umsatzversuch mit Ruhezellen (Abb. 2) mit den 4-FBS-Transformationsprodukten wurde von den Zellen getrennt, NADPH wurde zugegeben. In Gegenwart von zellfreiem Extrakt von *P. diminuta* wurde das 4-Carboxymethylenbutenolid enzymatisch schnell unter Maleylacetat-Bildung hydrologisiert. Letzteres wurde seinerseits durch Maleylacetat-Reduktase zu 3-Ketoadipinsäure reduziert. Da zur Umwandlung von 1 mol Maleylacetat in 3-Ketoadipinsäure 1 mol NADPH erforderlich ist, kann man leicht die Stöchiometrie des Vorgangs ausrechnen. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, wurden bei der Überführung in 3-Ketoadipat der Transformationsprodukte von 2,45  $\mu\text{mol}$  4-FBS durch die Zellen des ursprünglichen Stammes 2,55  $\mu\text{mol}$  NADPH benötigt. Das bedeutet, daß der 4-FBS-Kohlenstoff nicht in den Zentralmetabolismus eingeschleust wird, wie dies beim adaptierten Stamm der Fall ist, wo nur ein Viertel des organischen Kohlenstoffs nichtmineralisiert bleibt (26 %).

Die ermittelte Stöchiometrie wurde durch die Angaben der Manometerversuche bestätigt. Nach diesen Angaben, die aus der vorliegenden Arbeit und der Literatur /13, 15/ stammen, umfaßt der 4-FBS-Katabolismus folgende Etappen: 4-FBS  $\xrightarrow{\text{O}_2}$  4-FBK  $\xrightarrow{\text{O}_2}$  3-Fluormukonsäure  $\xrightarrow{-\text{HF}}$  4-Carboxymethylenbutenolid  $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$  Maleyllessigsäure  $\xrightarrow{2\text{H}}$  3-Ketoadipinsäure. Aus dem genannten Schema folgt, daß für die Oxidation von 1 mol 4-FBS in den Reaktionen



T a b e l l e 2  
 Reduktionsstöchiometrie der 4-FBS-Trans-  
 formationsprodukte

4-FBS-Transfor- mationsprodukte	NADPH-Menge, $\mu\text{mol}$		Menge des oxidier- ten NADPH, $\mu\text{mol}$	Endprodukte
	Anfangs- menge	End- menge		
ursprünglicher Stamm <sup>1)</sup>	3,1	0,55	2,55	3-Ketoadipin- säure
adaptierter Stamm <sup>2)</sup>	3,1	2,4	0,7	3-Ketoadipin- säure

Anmerkung: In die 1 ml Proben aus dem Umsatzversuch mit Ruhezellen wurden NADPH und der zellfreie Extrakt von *P. diminuta* INMI KIS-7 (0,11 mg Protein) gegeben. Das Volumen des Reaktionsgemisches wurde auf 2 ml mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,1 eingestellt. Die Reaktion erfolgte bei Zimmertemperatur. Während des Reaktionsverlaufs wurde die Veränderung der Extinktion bei 340 nm spektrophotometrisch untersucht, wobei das Reaktionsgemisch 10fach mit dem Puffer verdünnt wurde. Bei Abschluß der Reaktion (nach 5 - 10 min) wurde die Menge des übriggebliebenen NADPH berechnet, die Produkte wurden durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Der Blindversuch enthielt nur NADPH und den Extrakt in den genannten Mengen. Die NADPH-Oxidation im Blindversuch betrug unter 0,01  $\mu\text{mol}$  während des Versuches.

- 1) 3 h-Probe aus dem Umsatzversuch mit Ruhezellen (siehe Abb. 2 Variante A)
- 2) 5 h-Probe aus dem Umsatzversuch mit Ruhezellen (siehe Abb. 2 Variante B).

des Abbaus 2 mol  $\text{O}_2$  erforderlich sind, wenn im Medium keine beträchtlichen 4-FBK-Mengen vorhanden sind. Festgestellt wurde, daß für die Oxidation von 3,2  $\mu\text{mol}$  4-FBS durch die Zellen des ursprünglichen Stammes 6,2  $\mu\text{mol}$  Sauerstoff aufgebraucht werden. Beim adaptierten Stamm steigt diese Zahl auf 9,0  $\mu\text{mol}$   $\text{O}_2$ , was beweist, daß ein Teil der Transformationsprodukte in die Reaktionen des zentralen Metabolismus einbezogen sind.

Das Genannte läßt die Annahme zu, daß die "Engstelle" im 4-FBS-Metabolismus beim ursprünglichen Stamm der Übergang des Maleylacetats in Verbindungen ist, die in den Tricarbonsäure-Zyklus eingeschleust werden. Diese Schlußfolgerung konnten wir jedoch nicht verifizieren, da in den zellfreien Extrakten des ursprünglichen und des adaptierten Stammes von *C. fascians* nur einzelne Enzyme des 4-FBS-Metabolismus festgestellt wurden: Brenzkatechin-Dioxygenase und Mukonat-Cykloisomerase (Tab. 3). Aus den Angaben in Tab. 3 folgt, daß der ursprüngliche Stamm offensichtlich zwei Isoformen der Mukonat-Cykloisomerase besitzt. Die Inaktivierung beim mutierten Stamm von einem der Isoenzyme, bei dem *cis,cis*-Mukonsäure das Substrat ist, liegt dem Unvermögen von *C. fascians* INMI KIS-9 zum Wachsen auf BS zugrunde.

T a b e l l e 3  
Aktivität der Enzyme des 4-FBS-Metabolismus  
in zellfreien Extrakten von *C. fascians*

Ferment	Substrat	Aktivität, nmol/min·mg Protein	
		ursprünglicher Stamm	adaptierter Stamm
Brenzkatechin-Dioxygenase	Brenzkatechin	31	145
	4-Fluorbrenzkatechin	24	110
Mukonat-Cykloisomerase	<i>cis,cis</i> -Mukonsäure	43	0
	3-Fluormukonsäure	6 - 8	4 - 5

Anmerkung: Zellen des ursprünglichen Stammes, gezüchtet auf einem Medium mit 0,05 % BS; Zellen des adaptierten Stammes auf einem Medium mit 0,05 % 4-FBS. Die Aktivität der Brenzkatechin-Dioxygenase und Mukonat-Cykloisomerase wurden bestimmt, wie in /15/ beschrieben.

Bekanntlich kann die Aktivitätszunahme von einem oder mehreren Enzymen des Metabolismus einer der unmittelbaren Gründe für die Adaption der Mikroorganismen an neue Nahrungsquellen sein. So stellte man bei der Untersuchung der Adaption von *C. tropicalis* an L-Arabinose in unserem Labor eine Aktivitätszunahme der Polyoldehydrogenase fest, was uns zu der Fähigkeit führte, die L-Arabinose als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen /5/.

Unter Berücksichtigung dieses Umstandes kann man die Fähigkeit bei *C. fascians* INMI KIS-9 zur Nutzung von 4-FBS als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle in Verbindung bringen mit der Aktivitätszunahme von einem der letztgenannten Enzyme des Metabolismus, der Maleylacetat-Reduktase.

#### Literatur

1. Ивойлов В. С., Карасевич Ю. Н., Суrowцева Э. Г.//Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 3. С. 502.  
Ivojlov, V.S., Karasević, Ju.N., Surovceva, E.G.: O mutante *Corynebacterium fascians*, utrativšem sposobnost' k utilizaciji benzojnoj kisloty.  
In: Mikrobiologija. Moskva, 54 (1985), Nr 3, S. 502 - 504.  
/A *Corynebacterium fascians* mutant lacking the ability to utilize benzoic acids; russ./
2. Карасевич Ю. Н., Ивойлов В. С.//Микробиология. 1977. Т. 46. Вып. 5. С. 846.  
Karasević, Ju.N., Ivojlov, V.S.: Podgotovitel'nyj metabolizm para-oksibenzojnoj kisloty u drožžež *Candida tropicalis*.  
In: Mikrobiologija. Moskva, 46 (1977), Nr 5, S. 846 - 856.  
Engl.: Preparatory metabolism of para-hydrobenzoic acid in the yeast *Candida tropicalis*.  
In: Microbiology. New York, 46 (1977), Nr 5, S. 687 - 695.
3. Карасевич Ю. Н., Татарина Н. Ю.//Микробиология. 1979. Т. 48. Вып. 6. С. 980.  
Karasević, Ju.N., Tatarinova, N.Ju.: Utilizacija monoflorbenzojnych kislot bakterijami *Paracoccus denitrificans*.  
In: Mikrobiologija. Moskva, 48 (1979), Nr 6, S. 980 - 984.  
Engl.: Utilization of monofluorobenzoic acids by bacteria *Paracoccus denitrificans*.  
In: Microbiology. New York, 48 (1979), Nr 6, S. 798 - 801.
4. Суrowцева Э. Г., Ивойлов В. С., Карасевич Ю. Н.//Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 6. С. 1015.  
Surovceva, E.G., Ivojlov, V.S., Karasević, Ju.N.: O pričinach otsutstvija rosta na aniline štamma *Pseudomonas diminuta*, utilizirujuščego chlorirovannye aniliny.  
In: Mikrobiologija. Moskva, 54 (1985), Nr 6, S. 1015 - 1016.  
/Factors causing the absence of growth on aniline of a *Pseudomonas diminuta* strain assimilating chlorinated anilines; russ./

5. Шахова И. К. // Микробиология. 1973. Т. 42. Вып. 1. С. 99.  
Šachova, I.K.: Srovnitel'noe issledovanie polioldehidrogenaz *Candida tropicalis* X9, rastuščej na D-ksiloze, i ee mutanta, sposobnogo rasti na L-arabinoze.  
In: Mikrobiologija. Moskva, 42 (1973), Nr 1, S. 99 - 106.  
Engl.: Comparative investigation of the polyol dehydrogenases of *Candida tropicalis* X9 growing on D-xylose and of its mutant growing on L-arabinose.  
In: Microbiology. New York, 42 (1973), Nr 1, S. 82 - 88.
6. Ali, D.A., Callely, A.G., Hayes, M.: Ability of a vibrio grown on benzoate to oxidize para-fluorobenzoate.  
In: Nature. London, 196 (1962), Nr 4850, 13.10., S. 194 bis 195.
7. Bartels, Iris, Knackmuss, Hans-Joachim, Reineke, Walter: Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols.  
In: Applied and environmental microbiology. Baltimore, Md., 47 (1984), Nr 3, S. 500 - 505.
8. Clarke, K.F., Callely, A.G., Livingstone, A., Fewson, C.A.: Metabolism of monofluorobenzoates by *Acetivobacter calcoaceticus* N.I.C.B.8250.  
In: Biochimica et biophysica acta. Amsterdam, 404 (1975), Nr 2, S. 169 - 179.
9. Engesser, K.H., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J.: Adaption of *Alcaligenes eutrophus* B9 and *Pseudomonas* sp. B13 to 2-fluorbenzoate as growth substrate.  
In: Applied and environmental microbiology. Baltimore, Md., 39 (1980), Nr 1, S. 68 - 73.
10. Fewson, C.A., Kennedy, S.I.T., Livingstone, A.: Metabolism of monofluorobenzoates by *Bacterium* N.C.I.B.8250.  
In: Biochemical journal. London, 109 (1968), Nr 2, S. 6P bis 7P.
11. Goldman, Peter: Enzymology of carbonhalogen bonds.  
In: Degradation of synthetic organic molecules in the biosphere. Natural, pesticidal, and various other man-made compounds. Proceedings of a conference San Francisco, Ca., June 12 - 13, 1971. Washington, D.C.: National academy of sciences, 1972, S. 147 - 164.
12. Goldman, Peter, Milne, G.W.A., Pignataro, Maria T.: Fluorine containing metabolites formed from 2-fluorbenzoic acid by *Pseudomonas* species.  
In: Archives of biochemistry and biophysics. New York, 118 (1967), Nr 1, S. 178 - 184.
13. Harper, D.B., Blakley, E.R.: The metabolism of p-fluorobenzoic acid by a *Pseudomonas* sp.  
In: Canadian journal of microbiology. Ottawa, 17 (1971), Nr 8, S. 1015 - 1023.
14. Schmidt, Eberhard, Knackmuss, Hans-Joachim: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds.  
In: Biochemical journal. London, 192 (1980), Nr 2, S. 339 bis 347.
15. Schreiber, A., Hellwig, M., Dorn, E., Reineke, W., Knackmuss, H.-J.: Critical reactions in fluorbenzoic acid degradation by *Pseudomonas* sp. B13.  
In: Applied and environmental microbiology. Baltimore, Md., 39 (1980), Nr 1, S. 58 - 67.

16. Trauter, E.Karen, Cain, R.B.: The degradation of fluoroaromatic compounds to fluorocitrate and fluoroacetate by bacteria.  
In: Biochemical journal. London, 103 (1967), Nr 1, S. 22P bis 23P.

Institut für Mikrobiologie  
der Akademie der Wissenschaften  
der UdSSR, Moskva

Redaktionseingang:  
10.11.1985

Stuttgart, den 22. Dezember 1987

übersetzt von:

*Ottmar Pertschi*

(Ottmar Pertschi)  
Dipl.-Übersetzer