Third Symposium on Biotechnology of Coal and Coal-Derived Substances

Essen, September 23rd - 24th, 1991

K.H. Engesser, V. Strubel, S. Trenz, B. Rothe, A. Schmid und H.-J. Knackmuss

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, Azenbergstr. 18, 7000 Stuttgart 1, Tel. 07 11/1 21-12 24, Fax 07 11/1 21-12 13

DEGRADATION OF MODEL STRUCTURES OF COAL: PATHWAY OF DIBENZOFURAN AND FLUOREN DEGRADATION

DER ABBAU VON MODELLSTRUKTUREN DER KOHLE: STOFFWECHSELWEG DES DIBENZOFURAN- UND FLUORENABBAUS.

Abstract:
Several microorganisms have been isolated degrading structural elements of coal like dibenzofuran, fluorene and biphenyl. Extensive investigation of the degradation pathways revealed a common mechanism of initial attack. Although catalyzed by different enzymes, all three substrates are converted to 3-phenyl-substituted catechols, which, after meta-cleavage, are transformed to simple aromatic structures like salicylate, phthalate and benzoate. This ring cleaving enzymes have been cloned and are further analyzed after subcloning. Two different initial dioxygenases seem to be present in some strains catalyzing ether cleavage of dibenzofuran and oxygenation of biphenyl respectively. Attempts are presently made to clone the first enzyme in order to produce higher yields of its optically active products. Some of these compounds have been characterized and may be of commercial value as fine chemicals.

Zusammenfassung:
Es wurden Mikroorganismen isoliert, die Strukturelemente der Kohle wie Dibenzofuran, Fluoren sowie Biphenyl abbauen. Die eingehende Untersuchung der Abbauwege ergab einen identischen Mechanismus des Initialangriffs. Alle drei Substrate werden durch verschiedene Enzyme zu 3-Phenyl-substituierten Brenzkatechin-Derivaten umgesetzt, die nach meta-Spaltung weiter zu einfachen aromatischen Verbindungen wie Salicylat, Phthalat und Benzoat abgebaut werden. Die ringspaltenden Enzyme wurden kloniert und nach Subklonierung weiter analysiert. In Stämmen, die die Ether-Bindung in Dibenzofuran spalten und Biphenyl oxygenieren, scheinen zwei Initial-Dioxygenasen

vorhanden zu sein. Zur Zeit sind Versuche im Gange, das erste Enzym des Dibenzofuran-Abbauweges, das eine geringe Substratspezifität aufweist, zu klonieren, um die Ausbeute an optisch aktivem Produkt zu steigern. Einige dieser Produkte, die beim Umsatz verschiedener Substratanaloga entstehen, wurden charakterisiert und könnten als Feinchemikalien wirtschaftliche Bedeutung haben.

1. EINLEITUNG

In letzter Zeit sind die Möglichkeiten eines biologischen Abbaus bzw. einer Umwandlung von Kohle verstärkt Gegenstand des wissenschaftlichen Interesses. Dies liegt an den allgemein bekannten Vorteilen dieser Methode. So laufen biologische Prozesse bei niedrigen Temperaturen und Drücken ab und vermeiden so die Nachteile der thermochemischen Verfahren.

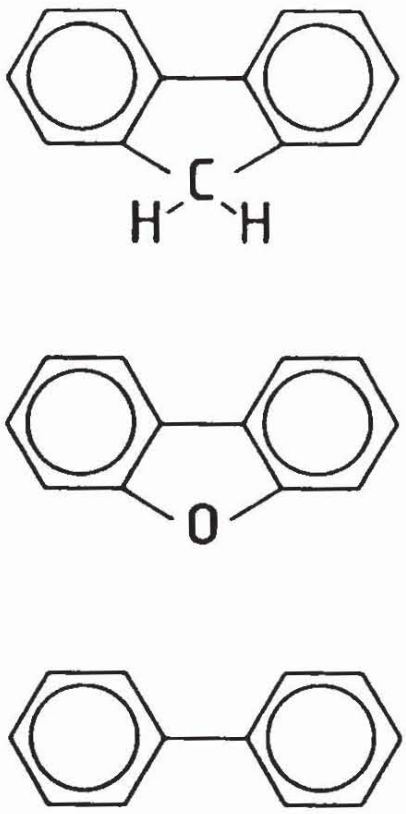


Abb. 1. Fluoren, Dibenzofuran und Biphenyl als Kohle-relevante Modellsubstrate

Die Analyse der Struktur von modellartigen "Kohlemolekülen" zeigt allerdings schnell, daß ein biologischer Abbau dieser Makromoleküle vor große Schwierigkeiten gestellt ist.
Während des Prozesses der Entstehung der Kohle im Rahmen von dia-genetischen Vorgängen wurde die ohnehin schon sehr komplexe Struktur

des Aus-gangsstoffes Lignin zu noch schwieriger abzu-bauenden Makromolekülen umgeformt. Aus diesem Grunde ist die Strategie, zunächst statt des komplexen Kohle-Moleküls einfachere Modellverbindungen zu untersuchen, sinnvoll, will man möglichst umfassende Kenntnisse über die "Biologiefähigkeit" dieses Naturstoffes gewinnen.

Als prominente Strukturelemente des Kohlemoleküls wurden deshalb Biarylether (z. B. Dibenzofuran), Fluoren, Biphenyl und Phenylcyclohexan gewählt (Abb. 1). Später war dann zu untersuchen, zu welchen Stoffwechselleistungen bei der Umwandlung kohlestämmiger Substanzen Mikroorganismen befähigt sind, die solche Modellsubstanzen abzubauen verstehen. Erst dann ist an ein Zusammenführen dieser Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen zu denken, die sich z. B. mit der Verflüssigung hochmolekularer Kohle beschäftigen.

2. DER BIOLOGISCHE ABBAU VON BIARYLETHERN

2.1. Der Abbau einfacher nichtzyklischer Arylether

Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß neben den bisher bereits bekannten Mechanismen der Spaltung von Aryl-Alkoxyl-Bindungen durch Monooxygenierung der Alkoxylgruppe noch andere Mechanismen existieren. So wurden neben der anaeroben Spaltung durch Methanbildner (Finster et al., 1990) Organismen aufgefunden, die eine Spaltung der Etherbindung nach Überführen in eine Esterbindung bewerkstelligten (Kersten et al., 1985). Ein gänzlich neuartiger Mechanismus ergab sich bei der Untersuchung des Abbaus des Modellsubstrates 2-Methoxybenzoat: In diesem Falle wurde das Abbauprinzip als Labilisierung einer chemisch sehr stabilen Etherbindung durch Transformation zu einem labilen Hemiacetal erkannt (Engesser et al., 1991). Der

dabei beschriebene Stamm, eine Pseudomonas Species, war recht vielseitig und metabolisierte auf diese Weise auch höhere Homologe des 2-Alkoxybenzoates (bis zu 2-n-Hexoxybenzoat) sowie 2-Methyl- und 2-Ethylaminobenzoat. Die nach dem nicht-enzymatischen Zerfall des Hemiacetals auftretenden Produkte waren zum Teil abbaubar (im Falle des Brenzchatechins), zum Teil wurden sie ins Medium ausgeschieden (niedere Alkohole). Dieses Abbauprinzip der initialen Etherspaltung fand Anwendung auch für einfache nichtzyklische Biarylether wie carboxylierte Diphenylether (Abb. 2). So zeigte sich, daß der Abbauweg sowohl für 3-Carboxy- als auch 4-Carboxybiphenylether über eine initiale Dioxygenierung in 1,2- bzw. 1,6-Stellung verläuft (Engesser et al., 1990). Das dadurch erzeugte Hemiacetal zer-

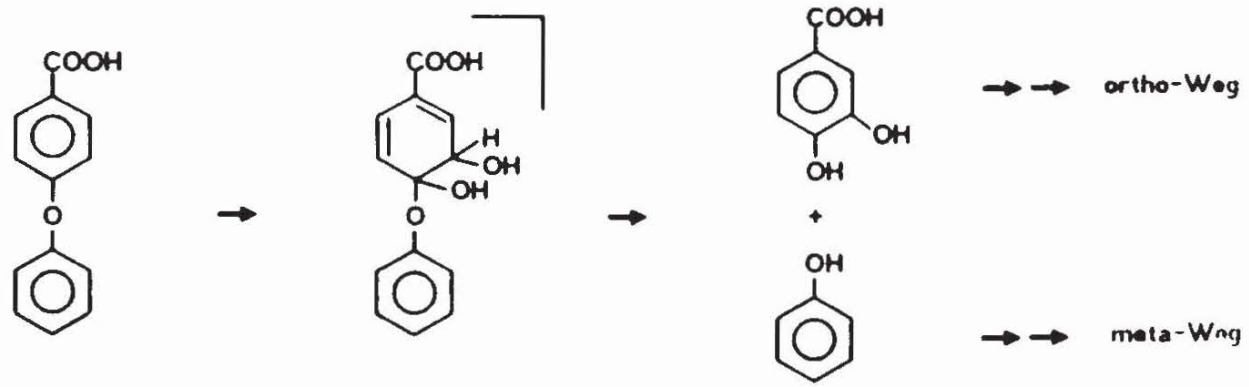


Abb. 2. Der Abbau von Carboxybiphenylethern durch Pseudomonas sp. POB 310

fällt chemisch zu 3,4-Dihydroxybenzoat (Protokatechuat) und Phenol. Beide Metabolite werden ohne Probleme über den ortho- bzw. meta-Weg verstoffwechselt. Zumindest die etherspaltende Initialenzymatik ist Plasmid-codiert und wird im Moment genetisch charakterisiert.

2.2. Der Abbau zyklischer Biarylether

Mit diesen Vorerkenntnissen fällt es leicht, auch für zyklische Biarylether wie Dibenzofuran als einfachstem Vertreter eine

Abbauhypothese aufzustellen. Demnach würde eine in diesem Falle als angulär zu bezeichnende initiale Dioxygenierung, wie in den vorherigen Beispielen beschrieben, zur Bildung eines Hemiacetals, in diesem Falle also 4,4a-Dihydro-4,4a-dihydroxydibenzofuran führen, dessen spontan verlaufender Zerfall unter Rearomatisierung 3-(2'-Hydroxyphenyl) brenzkatechin (HPC) ergäbe (Abb. 3). Dieses Produkt konnte denn auch nachgewiesen werden, wenn Dibenzofuran abbauende Bakterien (z. B. Brevibacterium Stamm DPO1361 oder Stamm DPO360) in Gegenwart von Enzyminhibitoren Dibenzofuran umsetzten. Solange der Hemmstoff 3-Chlorbrenzkatechin anwesend war, akkumulierten sich größere Mengen des obigen Intermediates, die nach Abbau des Inhibitors wiederum verschwanden. Eingehende Untersuchungen, die noch im Gange sind, zeigten dann, daß es in diesen Stämmen mehrere Typen von Enzymen gibt, die Brenzkatechin-Derivate einer sog. meta-Spaltung unterwerfen. Nach Klonierung der diese Enzyme codierenden Gene

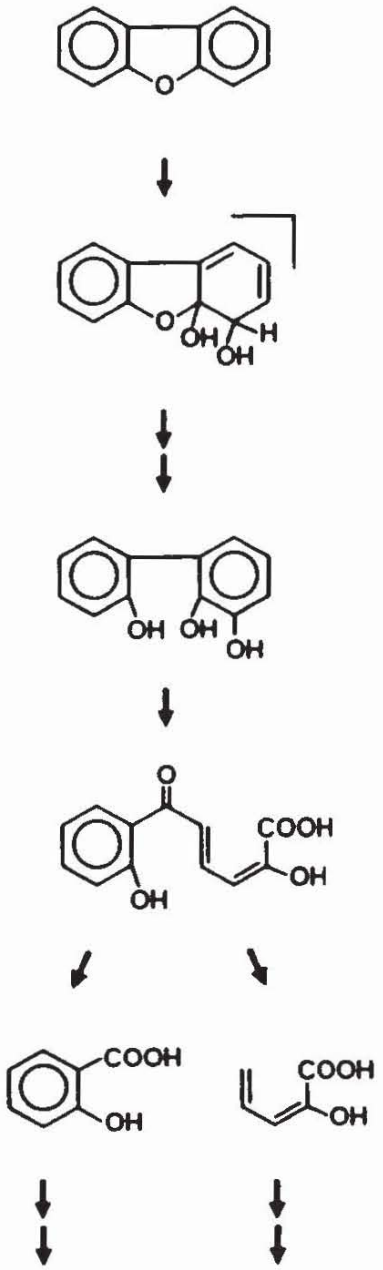


Abb. 3. Der Abbau von Dibenzofuran durch Brevibacterium sp. 1361

in einem Gram-negativen Escherichia coli-Stamm sollen die einzelnen Enzyme hinsichtlich ihrer Fähigkeiten, HPC zu metabolisieren, verglichen werden. Unglücklicherweise ist das Produkt der meta-Spaltung von HPC, die in 2'-Stellung hydroxysubstituierte 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenyl-2,4-hexadien-carbonsäure (2'-OH-HOPDA) chemisch instabil und zyklisiert schnell zu 3-(Chroman-4-on-2-yl)-pyruvat. Diese Verbindung ist als Artefakt anzusehen und wird biologisch nicht weiter abgebaut, ist aber chemisch instabil und zerfällt zu weiteren Produkten, die noch nicht charakterisiert sind.

Um eine Zyklisierung des Ringspaltungsproduktes von HPC zu vermeiden, verfügen die Dibenzofuran abbauenden Bakterien über hydrolysierende Enzyme, die dieses Produkt, 2'-OH-HOPDA, zu 2-Oxo-pent-4-enoat und Salicylat umsetzen. Der weitere Abbau von Salicylat verläuft über Brenzkatechin, das über den sog. meta-Weg vollständig verstoffwechselt wird. In diesen Weg fließt wohl auch das obengenannte zweite Produkt der Hydrolyse ein (Strubel et al., 1991).

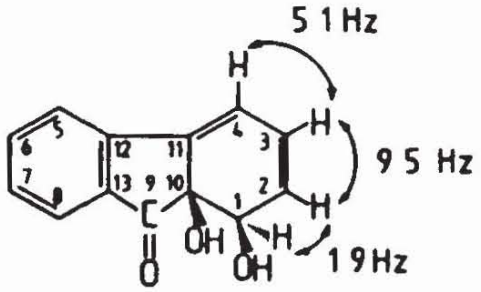


Abb. 4. Produkt des Umsatzes von Fluoren durch Dibenzofuran abbauende Bakterien

Damit sind die Grundlagen des bakteriellen Abbaus von Dibenzofuran geklärt. Eine weitere Unterstützung des vorgeschlagenen Abbauweges ergab sich bei der Untersuchung der Umsetzung von Fluoren durch Dibenzofuran aktiv verstoffwechselnde Zellen der Stämme DPO1361 und DPO220

(Engesser et al., 1989). Dabei wurde als ein Hauptprodukt ein relativ säure-stabilesDiendiol des Fluoren-9-ons erkannt, 1,10-Dihydro-1,10-dihydroxy-fluoren-9-on (Abb. 4).

Wahrscheinlich wird diese Verbindung durch anguläre Dioxygenierung von Fluoren-9-on gebildet. Die eingehende strukturelle Charakterisierung dieses Fluoren-Metaboliten ließ sogar erkennen, daß die Sauerstoff-atome beide in cis-Stellung eingefügt wurden, es sich also wirklich um eine Dioxygenase-Reaktion handelt.

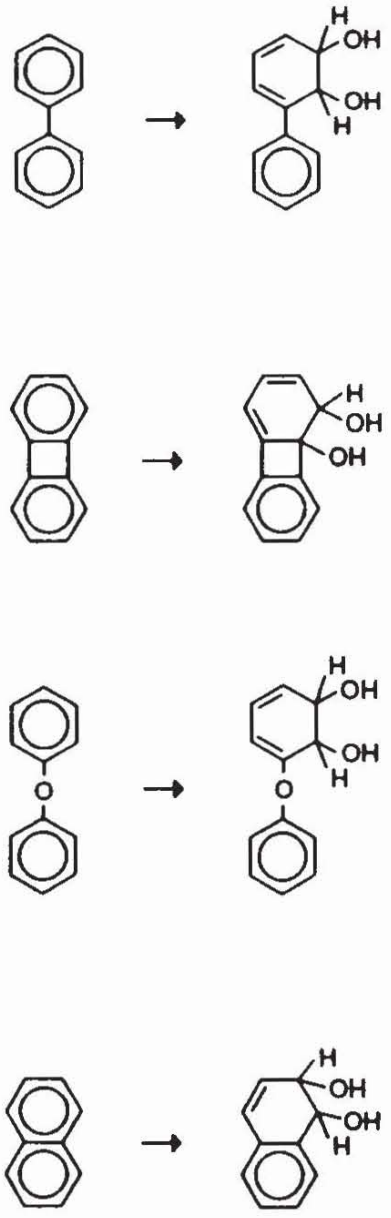


Abb. 5. Produktion von optisch aktiven Diendiolen durch anguläre Dibenzofuran-Dioxygenasen

3. BEZIEHUNGEN ZUM ABBAU VON BIPHENYL

Der somit weitgehend aufgeklärte Abbauweg von Dibenzofuran weist formal große Ähnlichkeit mit dem von Biphenyl auf (siehe hierzu Catelani et al., 1971). Aus diesem Grunde wurden Dibenzofuran abbauende Zellen des Stammes DPO1361 mit Biphenyl inkubiert. Es kam zur Ausscheidung einer säureinstabilen Verbindung, die als 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxy-biphenyl charakteri-

siert werden konnte (Abb. 5). Diese Verbindung enthält wie das schon erwähnte Fluorenon-Derivat, zwei optisch aktive Kohlenstoffatome und wurde nach längerer Inkubation wieder umgesetzt. Bei näherer Betrachtung ergab sich, daß Dibenzofuran abbauende Bakterien in aller Regel zum Abbau auch von Biphenyl befähigt sind. Allerdings handelt es sich hierbei keinesfalls um einen Abbauweg, der identisch ist mit demjenigen von Dibenzofuran. Zumindest auf der Ebene der Dehydrogenierung von 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl sowie der Ringspaltung von 3-Phenylbrenzkatechin werden nach eingehenden enzymatischen Untersuchungen mittels FPLC zusätzliche Enzyme induziert. Weiter ist der Abbau der Bruchstücke der HOPDA-Hydrolyse-Reaktion noch ungeklärt. Festzuhalten bleibt, daß zwischen dem Abbau von Dibenzofuran und dem von Biphenyl zumindest enge Wechselbeziehungen gegeben sind und die einzelnen Enzyme offensichtlich beim Abbau des jeweils analogen Substrates einander "aushelfen" können.

4. DER ABBAU VON FLUOREN

Interessanterweise konnten auch viele Dibenzofuran verwertende Bakterienstämme (nicht nur die bisher erwähnten) auch an das Wachstum auf Fluoren adaptiert werden. Dies war überraschend, da eine anguläre Dioxygenierung von Fluoren oder seinen Derivaten, wie oben beschrieben, zu einem Produkt führen müßte, das, im Vergleich zum analogen Produkt des Dibenzofuranabbaus, chemisch stabil sein sollte. In völligem Gegensatz zu dieser Annahme fand sich im Extrakt dieser Bakterien ein Enzym, das den Umsatz von 1,10-Dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-on zu vermutlich 3-(2'-Carboxyphenyl)brenzkatechin (CPC) katalysierte (Abb. 6). Dieses Produkt neigt stark zur intramolekularen Laktonisierung, so daß als gut faßbares und charakterisierbares Artefakt das Lakton des CPC beschrieben werden konnte. Im

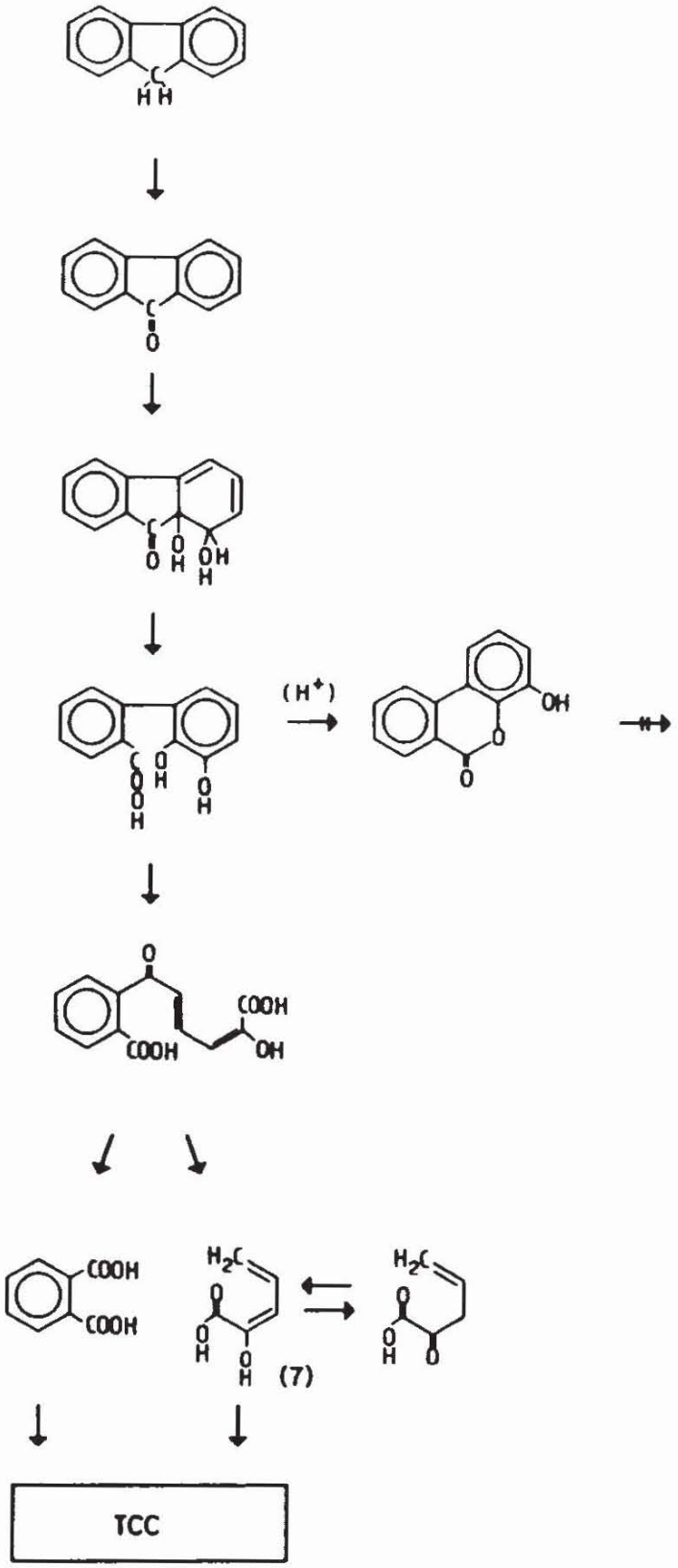


Abb. 6. Der Abbau von Fluoren durch Dibenzofuran-verwertende Bakterien

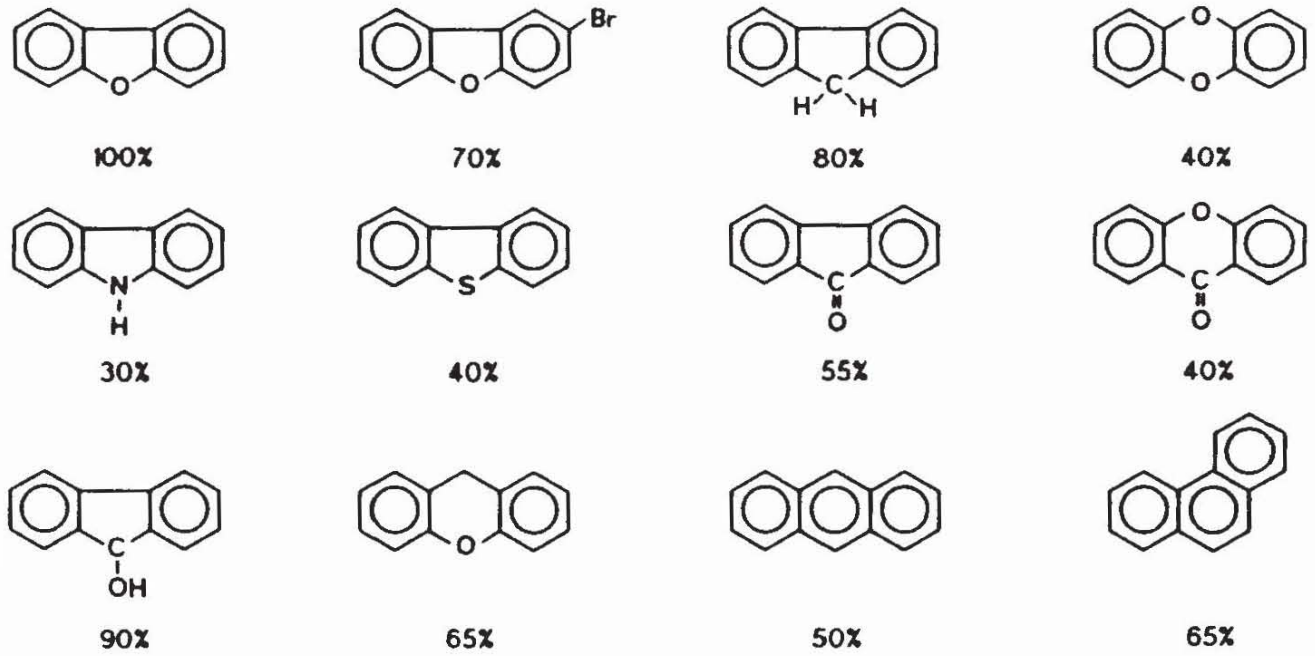
Moment in Arbeit ist die Aufklärung des weiteren Abbauweges. Es ist zu klären, welche der oben erwähnten Metapyrocatechasen den Umsatz von CPC bewerkstelligt und ob ein Enzym vom Typ der HOPDA-Hydrolase (siehe oben) für die beobachtete Entstehung von Phthalat verantwortlich ist. Der weitere Abbau von Phthalat ist ebenfalls noch ungeklärt; er verläuft nicht über eine 4,5-Dioxygenierung, wie sie für den gewöhnlich beschriebenen Phthalatabbau typisch ist.

5. UMSATZKAPAZITÄT VON ANGULÄR DIOXYGENIERENDEN INITIALENZYMEN

Bei der Untersuchung des Abbaus von Dibenzofuran, Biphenyl sowie Fluoren deutete sich an, daß diese Substrate eine gemeinsame Abbauklasse bilden, d.h. daß Bakterien, die eine dieser Substanzen verwerten, in der Regel auch zur Verwertung der jeweils anderen "Klassenmitglieder" befähigt sind. Entgegen der daraus folgenden Erwartung, es könnten alle diese Verbindungen durch ein Initialenzym umgesetzt werden, stellte sich heraus, daß je nach Wachstumssubstrat mindestens zwei voneinander deutlich unterschiedene Initialdioxygenasen induziert werden. Während eine davon nur ein eingeschränktes Substratspektrum bewältigt, katalysiert das zweite, als DBF-Dioxygenase zu bezeichnende Enzym den Umsatz einer Vielzahl von Substanzen wie z. B. Biphenyl, Fluoren, Anthracen und Xanthen. In der Regel findet sich hierbei mindestens ein Produkt nach Ende des Umsatzes im Medium (Abb. 5). Die genauere Charakterisierung ergab, daß z. B. Biphenylen zu einem bisher nicht beschriebenen, angulären Diendiol umgesetzt wird, das durch anguläre cis-Dihydroxylierung entstanden ist. Biphenyl wurde quantitativ zu 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl metabolisiert, ebenfalls ein optisch-aktives Produkt. Im Moment sind weitere Forschungsarbeiten im Gange, die die Umwandlung

einer Vielzahl von Aromaten in optisch aktive Diendiole zum Ziel haben.

Die Umsatzkapazität solcher initialer Dioxygenasen wurde beispielartig für den Stamm DPO220 näher untersucht (Abb. 7). Dabei ergab sich, daß neben den bereits erwähnten Aromaten auch 2-Bromdibenzofuran, 9-Oxofluoren, Phenanthren, Xanthon, Dibenzo-p-dioxin, Dibenzothiophen, Carbazol sowie Naphthalin zu Produkten umgesetzt wurden, deren Charakterisierung z. T. gelungen, z. T. noch in Arbeit ist.



bb. 7. Umsatz von Ether- analogen Substraten durch das Dibenzofuran abbauende Bakterium Stamm DPO 220

Da ein Problem bei diesen Umsatzversuchen die zuweilen geringe Expression des Initialenzyms ist, werden im Moment umfangreiche Versuche unternommen, dieses Enzym zu klonieren und seine

Expression zu erhöhen. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise bestünde darin, daß dadurch auch die nachfolgenden Enzyme abgetrennt werden, deren Aktivität häufig zu erheblichen Ausbeuteverlusten führt.

Die kürzlich publizierte Klonierung eines Octan-hydroxylierenden Oxygenase-Systems in Escherichia coli erwies, daß auch genetisch manipulierte Enzyme mit hoher Expressionsrate stabil etabliert werden können (Favre-Bulle et al., 1991).

Die auf diesem Wege aus kohlestämmigen Substanzen darstellbaren optisch aktiven Verbindungen haben potentiellen Wertstoffcharakter. So wurde für ein Cyclohexadiendiol gezeigt, daß nach Polymerisation optisch aktive Polymere entstehen (Ballard et al., 1983). Auch als Synthon für chemische Synthesen sind diese Verbindungen wertvoll. So zeigten Ley et al. (1987), daß Pinitol aus 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadien durch chemische Synthese zugänglich wird, wobei die zwei im Ausgangsmolekül bereits vorhandenen optisch aktiven Kohlenstoffatome den Schwierigkeitsgrad der Gesamtsynthese wesentlich erniedrigen.

Abschließend darf vermutet werden, daß auf diesem Wege "low-value" Produkte quasi meliorisiert werden können. Diese Arbeiten könnten einen Beitrag dazu darstellen, der Kohle den ihr gemäßen Wert zurückzugeben, den sie im Moment an Erdöl und Erdgas verloren hat.

1. Ballard, D. G. H., Courtis, A., Shirley, I. M. and Taylor, S. C. (1983) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 954-955.
2. Catelani, D., Sorlini, C. and Treccani, V. (1971) Experientia 27, 1173-1174.
3. Engesser, K. H., Fietz, W., Fischer, P., Schulte, P. and Knackmuss, H.-J. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 69(3), 317-321.
4. Engesser, K.-H., Strubel, V., Christoglou, K., Fischer, P. and Rast, H. G. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 65, 205-210.
5. Engesser, K.-H., Strubel, V., Kirchner, S., Schestag, S., Schulte, P. and Knackmuss, H.-J. (1991) gwf Wasser Abwasser 132(4), 239-241.
6. Favre-Bulle, O., Schouten, T., Kingma, J. and Witholt, B. (1991) Bio/Technology 9(4), 367-371.
7. Finster, K., King, G. M. and Bak, F. (1990) FEMS Microbiol. Ecol. 74(4), 295-301.
8. Kersten, P. J., Chapman, P. J. and Dagley, S. (1985) J. Bacteriol. 162, 693-697.
9. Kersten, P. J., Dagley, S., Whittaker, J. W., Arciero, D. M. and Lipscomb, J. D. (1982) J. Bacteriol. 152(3), 1154-1162.
10. Ley, S. V., Sternfeld, F. and Taylor, S. (1987) Tetrahedron Lett. 28(2), 225-226.
11. Strubel, V., Engesser, K. H., Fischer, P. and Knackmuss, H.-J. (1991) J. Bacteriol. 173(6), 1932-1937.