

Die Spaltung von Arylether-Bindungen durch initiale Dioxygenierung: Grundlage des bakteriellen Dioxinabbaus

K.-H. Engesser, V. Strubel, S. Kirchner, S. Schestag, P. Schulte und H. J. Knackmuss

Schlagwörter: Biotechnologie, Alkoxybenzoatabbau, Dioxinabbau, Aryletherspaltung

Bei der Untersuchung des bakteriellen Abbaus von Arylether-Modellsubstraten wie 2-Alkoxybenzoat, Carboxybiphenylether und Dibenzofuran wurde ein grundlegender Mechanismus für die Spaltung von Aryletherbindungen aufgedeckt. Demnach bewirken Dioxygenase-Enzyme unter Einführung zweier Hydroxylgruppen die Überführung von Ether- in Hemiacetalbindungen. Diese instabilen Hemiacetale reagieren unter Rearomatisierung zu aliphatischen Alkoholen und/oder Phenolverbindungen ab. Enzyme dieses Typs sind auch in der Lage, Dioxine zu spalten.

During investigations on the bacterial metabolism of aryl ether model compounds like 2-alkoxybenzoates, carboxybiphenylethers and dibenzofuran, a basic mechanism for cleavage of aryl ether bonds was revealed. Accordingly dioxygenase enzymes insert two hydroxyl groups into ether compounds in such a way that stable ether bonds are transformed into labile hemiacetal bonds. The hemiacetal compounds with concomitant rearomatization rearrange to aliphatic alcohols and/or phenolics. Enzymes of this highly specialized type are also able to cleave ether bonds in dioxin structures.

1. Einführung

Biarylether haben in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung erlangt, da einige halogenierte Vertreter dieser Substanzklasse wie z.B. das sog. Seveso-Dioxin (TCDD oder 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin) zur Gruppe der hochgefährlichen und gleichzeitig sehr schwer biologisch abbaubaren Verbindungen gehören [1; 2]. Um die recht geringen Kenntnisse über die Möglichkeiten eines biologischen Abbaus dieser Verbindungen zu erweitern, wurden zunächst grundlegende Untersuchungen mit Modellsubstanzen durchgeführt. Als einfachste Modellverbindung eines Aryl-Alkylethers wurde zunächst 2-Methoxybenzoat untersucht.

2. Der bakterielle Abbau von 2-Alkoxybenzoaten

Obwohl allgemein über den Abbau von Alkoxybenzoaten vor allem von 3- und 4-substituierten Verbindungen viele Erfahrungen vorliegen, wurde bisher am bakteriellen Abbau von 2-Alkoxybenzoaten nur wenig gearbeitet. Unter Verwendung einer speziellen Selektionsstrategie

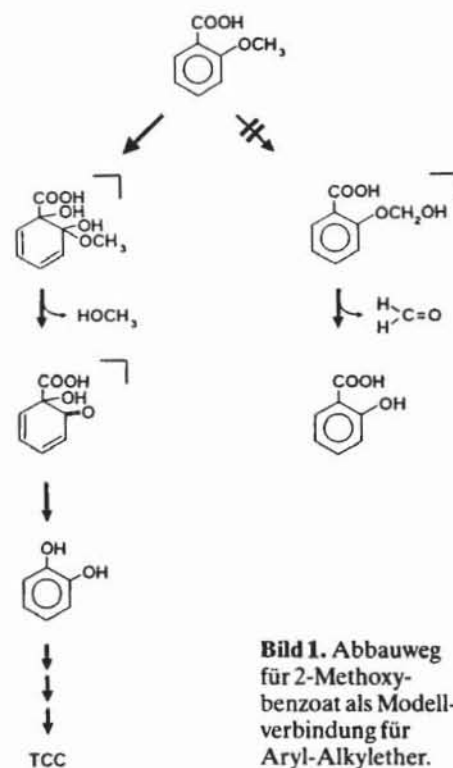


Bild 1. Abbauweg für 2-Methoxybenzoat als Modellverbindung für Aryl-Alkylether.

wurden Bakterien isoliert, die 2-Methoxybenzoat nicht nach Oxygenierung der Seitenkette oder einem reduktiven Angriff abbauten, sondern die Methoxygruppe als Methanol abspalten (Bild 1). Gleichzeitig konnte das intermediäre Auftreten von Brenzcatechin beobachtet werden, das dann über den sogenannten ortho-Weg verstoffwechselt wurde [3]. Diese Bakterien sind interessanterweise auch zum Abbau von 2-Alkoxybenzoaten mit längerer Seitenkette (bis zu C₆) sowie von anderen, in ortho-Stellung mit anionisch eliminierbaren Abgangsgruppen substituierten Benzoaten befähigt (Bild 2). Entscheidend dabei ist die Tatsache, daß die Ether-Bindung

Posterpräsentation anlässlich des 7. DECHEMA-Fachgespräches Umweltschutz am 12./13.3.1990 in Frankfurt/Main.

Dr. K.-H. Engesser, V. Strubel, S. Kirchner, P. Schulte und Prof. Dr. H. J. Knackmuss, Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart; S. Schestag, Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart.

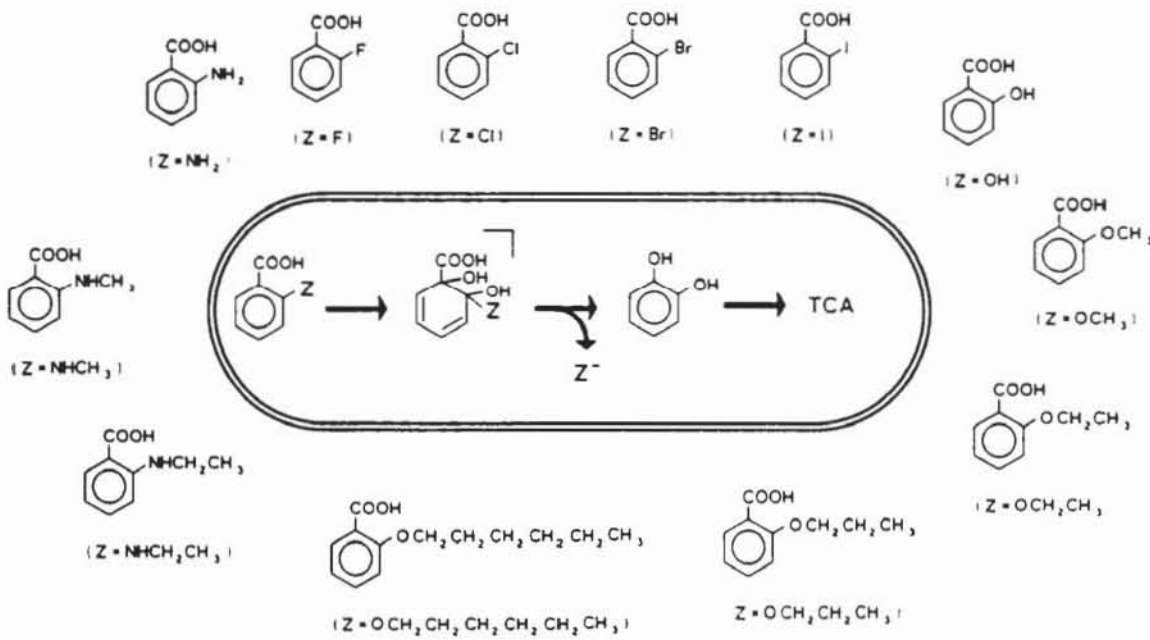


Bild 2. Abspaltung von anionisch eliminierbaren Substituenten nach initialer Dioxygenierung.

aufgrund der ausschließlich proximal zum Ethersubstituenten erfolgenden Dioxygenierung bereits im ersten Schritt gespalten wird. Eine distale Dioxygenierung würde dagegen zur Entstehung von Alkoxy-substituierten Brenzkatechinen führen, für die bisher kein produktiver Metabolismus bekannt ist. Eine Seitenkettenoxidation mit Formaldehyd als Intermediat (*Bild 1*, rechter Ast), wie sie ansonsten beim Abbau von Alkoxybenzoaten üblich ist, konnte klar ausgeschlossen werden.

3. Der Metabolismus von carboxylierten Biphenylethern

Einer der einfachsten Biarylether ist der 4-Carboxybiphenylether. Sein Metabolismus in Bakterien wurde eingehend untersucht [4]. Demnach wird auch hier der Abbau durch eine Dioxygenase eingeleitet, die wie im Falle der Alkoxybenzoate schon im ersten Schritt die Etherbindung unter Bildung eines Hemiacetals labilisiert. Die spontane Spaltung ergibt Phenol und 3,4-Dihydroxybenzoat. Beide Metaboliten können problemlos über den sogenannten meta-Weg bzw. Protokatechusäureweg abgebaut werden. Auch hier ist also als Abbauprinzip die Spaltung der Etherbindung im ersten Schritt des Abbauges entscheidend (s. *Bild 3*). Über diesen Abbauges können auch fluorierte Analoga teilweise unter Dehalogenierung metabolisiert werden.

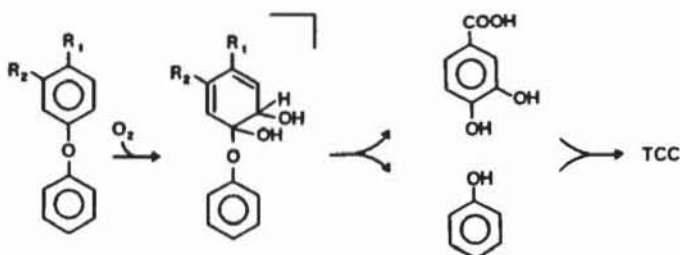


Bild 3. Abbau von Carboxybiphenylethern nach initialer Dioxygenierung (R₁ = COOH, R₂ = H: 4-Carboxybiphenylether; R₁ = H, R₂ = COOH: 3-Carboxybiphenylether).

4. Der bakterielle Abbau von Dibenzofuran

Dibenzofuran (DBF) kann als einfachster zyklischer Biarylether von einer ganzen Reihe Bakterien abgebaut werden [5]. Bei der Untersuchung des Abbauges stellte sich heraus, daß der Initialangriff in einer angulären Dioxygenierung besteht, die unmittelbar zur Spaltung der Etherbindung unter Ausbildung eines 3-(2-Hydroxyphenyl)brenzkatechins führt [6]. Die Ringspaltung dieses Substrates durch eine Dioxygenase führt zu einem äußerst labilen Produkt, das bei unzureichender Aktivität des Nachfolgeenzym, einer Hydrolase, spontan einer Zyklisierung unterliegt (*Bild 4*). Da das dadurch entstehende Chromanon-Analogon einem weiteren Abbau nicht zugänglich ist, bedarf es einer präzisen Abstimmung der am Abbau beteiligten Enzymaktivitäten, um eine vollständige Substratverwertung zu erzielen [7].

5. Zusammenfassung und Ausblick auf den Abbau von Dioxinen

Den vorgestellten bakteriellen Abbauges für verschiedene Arylether liegt ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde. Dioxygenase-Enzyme wandeln eine stabile Etherbindung nach Doppelhydroxylierung in ein instabiles Hemiacetal um. Auf diese Art und Weise wird die Etherbindung im ersten Schritt gespalten. Für den Metabolismus von halogenierten Biarylethern bedeutet dies, daß im Falle des Dibenzofurans und seiner Analoga dadurch ein wesentlicher Grund für die Resistenz dieser Verbindungen, die hohe Stabilität von Etherbindungen, entfällt. Beim Abbau von Dioxinen ist die Situation komplexer (s. *Bild 5*). Ein Initialangriff in angulärer Position führt zur Spaltung nur einer Etherbindung. Die anschließende Ringspaltung des dadurch gebildeten Brenzkatechin-Analogen überführt die verbliebene Etherbindung in eine Esterbindung, die wiederum leicht zu spalten sein sollte. Tatsächlich sind einige Dibenzofuran ab-

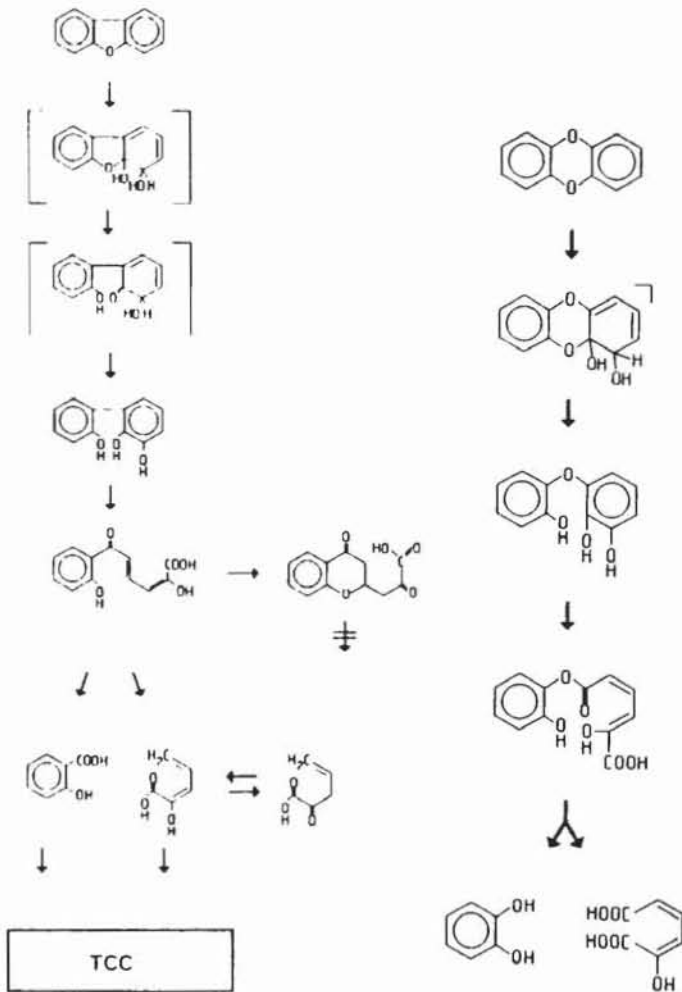


Bild 4. Abbauweg für Dibenzofuran als einfachstem cyclischen Biarylether.

Bild 5. Postulierter Abbauweg für Dibenzodioxin.

bauende Bakterien auch zum Umsatz von Dibenzodioxin (eigene Resultate, unveröffentlicht.) sowie seiner mono- und dichlorierten Analoga (pers. Mittlg. Dr.

Rast, Bayer AG) befähigt. Die gegenwärtig laufenden Forschungsarbeiten konzentrieren sich deshalb auf den Mechanismus des Abbaus von Dibenzodioxin als Grundkörper der eigentlichen Problemstoffe, den polychlorierten Dioxinen wie z.B. TCDD. Die dabei gewonnenen Erfahrungen sollten helfen, auf dem Wege der Entwicklung eines biologischen Systems zur Entgiftung von halogenierten Dibenzofuranen und Dibenzodioxinen Fortschritte zu machen.

Literatur

- [1] Arthur, M. F. und Frea, J. I.: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Aspects of its important properties and its potential biodegradation in soils. J. Environ. Qual. 18 (1989), S. 1-11.
- [2] Lilienfeld, D. E. und Gallo, M. A.: 2, 4-D, 2, 4, 5-T, and 2, 3, 7, 8-TCDD: An overview. Epidemiol. Rev. 11 (1989), S. 28-58.
- [3] Engesser, K.H. und Schulte, P.: Degradation of 2-bromo-, 2-chloro- and 2-fluorobenzoate by Pseudomonas putida CLB250: FEMS Microbiol. Lett. 60 (1989) S. 143-148.
- [4] Engesser, K.H., Fietz, W., Fischer, P., Schulte, P. und Knackmuss, H.-J.: Dioxygenolytic cleavage of aryl ether bonds: 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxy-4-carboxybenzophenone as evidence for initial 1,2-dioxygenation in 3- and 4-carboxy biphenyl ether degradation. FEMS Microbiol. Lett. 69 (1990), S. 317-322.
- [5] Strubel, V., Rast, H. G., Fietz, W., Knackmuss, H.-J. und Engesser, K.H.: Enrichment of dibenzofuran utilizing bacteria with high cometabolic potential towards dibenzodioxin and other anellated aromatics. FEMS Microbiol. Lett. 58 (1989), S. 233-238.
- [6] Engesser, K.H., Strubel, V., Christoglou, K., Fischer, P. und Rast, H. G.: Dioxygenolytic cleavage of aryl ether bonds: 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one, a novel arene dihydrodiol as evidence for angular dioxygenation of dibenzofuran. FEMS Microbiol. Lett. 65 (1989), S. 205-210.
- [7] Strubel, V., Engesser, K.H., Fischer, P. und Knackmuss, H.-J.: 3-(2-Hydroxyphenyl) catechol as substrate for proximal meta ring cleavage in dibenzofuran degradation by Brevibacterium sp. DPO 1361 (in Vorbereitung).

(Manuskripteingang: 1.10.1990)