

Peroxygenase-katalysierte Oxyfunktionalisierung angetrieben durch Methanoloxidation

Yan Ni[†], Elena Fernández-Fueyo[†], Alvaro Gomez Baraibar, René Ullrich, Martin Hofrichter, Hideshi Yanase, Miguel Alcalde, Willem J. H. van Berkel und Frank Hollmann*

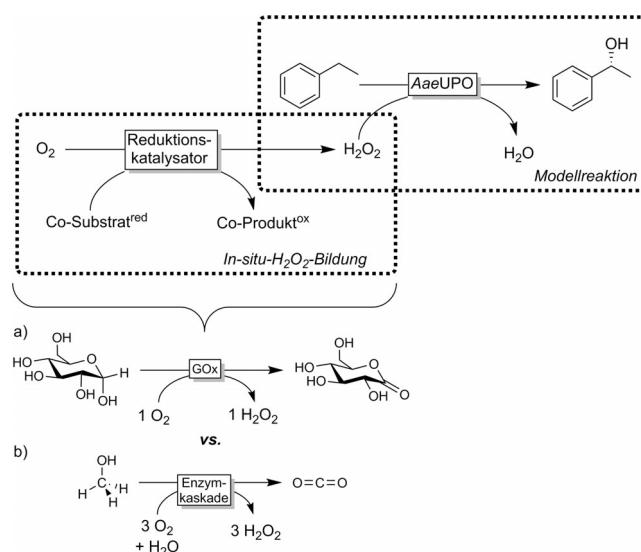
Abstract: Peroxygenasen katalysieren eine Vielzahl stereoselektiver Oxyfunktionalisierungen unter Verwendung von Wasserstoffperoxid als einzigem Oxidationsmittel. Allerdings werden Peroxygenasen auch durch H_2O_2 irreversibel inaktiviert. Für robuste Peroxygenase-Reaktionen ist also eine effiziente In-situ-Bereitstellung von H_2O_2 unabdingbar. Hier beschreiben wir eine neuartige Enzymkaskade zur reduktiven Aktivierung von Luftsauerstoff unter Verwendung von Methanol als stöchiometrischem Reduktionsmittel. Am Beispiel der stereoselektiven Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol zeigen wir die effiziente Nutzung aller in Methanol gespeicherten Reduktionsäquivalente zur reduktiven Aktivierung von O_2 .

Selektive Oxyfunktionalisierungen stellen eine der großen Herausforderungen der organischen Chemie dar.^[1] Insbesondere P450-Monoxygenasen stehen bereits seit über zwei Dekaden im Zentrum des Interesses.^[2] Weniger verbreitet sind die Peroxygenasen.^[3] Peroxygenasen zeigen eine ähnlich reichhaltige Oxyfunktionalisierungsschemie wie P450-Monoxygenasen: Die Katalyseprinzipien beider Enzymklassen beruhen auf einer hochreaktiven Oxyferrylspezies (Compound I) eingebettet in die sterisch wohldefinierte Umgebung der aktiven Tasche.^[4] Sowohl P450-Monoxygenasen als auch Peroxygenasen verbinden so auf einzigartige Weise Aktivität und Selektivität.

Im Unterschied zu den P450-Monoxygenasen benötigen Peroxygenasen allerdings keine komplexen Elektronen-transportketten zur Regenerierung ihrer katalytisch aktiven Form (Compound I). Stattdessen verwenden sie Wasserstoffperoxid, und daher sind sie augenscheinlich praktikablere Alternativen. Darüber hinaus ist in den letzten Jahren die Zahl an verfügbaren Peroxygenasen stark gewachsen.^[3c,5]

Allerdings stellt die geringe Stabilität von Peroxygenasen in Gegenwart von H_2O_2 eine große praktische Herausforderung dar. In der Literatur sind zahlreiche enzymatische,^[6] elektrochemische^[7] und photochemische^[8] Methoden zur In-situ-Bereitstellung von H_2O_2 durch katalytische Reduktion von Luftsauerstoff bekannt.

Weitverbreitet ist das H_2O_2 -Erzeugungssystem basierend auf der Glucose-Oxidase-katalysierten aeroben Oxidation von Glucose (Schema 1). Allerdings ist Glucose aus atom-



Schema 1. Selektive Oxyfunktionalisierung mit Peroxygenasen (z. B. stereoselektive Hydroxylierung von Ethylbenzol durch die Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita*, AaeUPO) angetrieben durch in situ Bereitstellung von H_2O_2 . Dargestellt sind a) der weitverbreitete Ansatz unter Verwendung von Glucose-Oxidase (GOx) und b) die angestrebte vollständige Oxidation von Methanol.

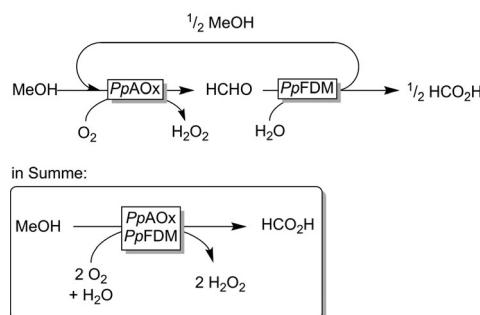
[*] Dr. Y. Ni,^[†] Dr. E. Fernández-Fueyo,^[†] Dr. A. G. Baraibar, Dr. F. Hollmann
Department of Biotechnology, Delft University of Technology
Julianalaan 136, 2628BL Delft (Niederlande)
E-Mail: f.hollmann@tudelft.nl
Dr. R. Ullrich, Prof. Dr. M. Hofrichter
Department für Bio- und Umweltwissenschaften
Technische Universität Dresden – Internationales Hochschulinstitut
Zittau, 02763 Zittau (Deutschland)
Prof. Dr. H. Yanase
Department of Chemistry and Biotechnology
Graduate School of Engineering, Tottori University
4-101 Koyamacho-Minami, Tottori, Tottori 680–8552 (Japan)
Prof. Dr. M. Alcalde
Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis, CSIC
28049 Madrid (Spanien)
Prof. Dr. W. J. H. van Berkel
Laboratory of Biochemistry, Wageningen University
Drielenlaan 3, 6703 HA Wageningen (Niederlande)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507881> zu finden.

Aktivierung von molekularem Sauerstoff genutzt werden. Erste Versuche von Therisod und Mitarbeitern fanden jedoch wenig Beachtung.^[9] Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass lediglich der erste Oxidationsschritt (Methanol zu Formaldehyd) beschrieben wurde. Abgesehen davon, dass Methanol nur unvollständig verwertet wird ist Formaldehyd auch aus gesundheitlicher Sicht und hinsichtlich der Enzymstabilität fragwürdig. Wir haben diesen Ansatz nun wieder aufgegriffen und durch weitere enzymatische Schritte zur vollständigen Oxidation zu CO_2 ergänzt.

Als Modellreaktion wurde die Hydroxylierung von Ethylbenzol gewählt. Die hochstereoselektive Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (AaeUPO, E.C.1.11.2.1) steht stellvertretend für die Klasse der Peroxygenasen.^[3b,5,8b,10] Es sei darauf hingewiesen, dass alle hier beschriebenen Reaktionen hochstereoselektiv verliefen ($> 99\% \text{ ee}$).

Für den ersten Schritt der angestrebten Kaskade (Oxidation von Methanol zu Formaldehyd, Schema 2) wurden



Schema 2. Doppelte Methanoloxidation zu Ameisensäure und Bildung von zwei Äquivalenten H_2O_2 durch Kombination von Alkohol-Oxidase (*PpAOx*) und Formaldehyd-Dismutase (*PpFDM*).

zwei kommerziell verfügbare Alkoholoxidasen (aus *Candida boidinii* und *Pichia pastoris*) getestet. Letztere (*PpAOx*) ergab dabei die deutlich höhere Aktivität ($\text{TF}(\text{PpAOx}) = 30 \text{ s}^{-1}$, Abbildung SI2) und wurde für alle weiteren Experimente verwendet. Da AaeUPO, wie alle Häm-abhängigen Enzyme, schnell und irreversibel durch H_2O_2 inaktiviert wird, muss die H_2O_2 -Konzentration in situ so gering wie möglich gehalten werden. Eine systematische Variation der relativen Konzentrationen von AaeUPO und *PpAOx* ergab, dass ein molares Verhältnis von etwa eins optimal hinsichtlich Aktivität und Stabilität des Gesamtsystems ist (Abbildung SI3).

Zur Entfernung des toxischen Formaldehyds bedienten wir uns des Enzyms Formaldehyd-Dismutase (FDM, E.C. 1.2.). FDM katalysiert die Disproportionierung von Formaldehyd in Methanol und Ameisensäure (Schema 2), was nach einigen Iterationen (zusammen mit *PpAOx*) die vollständige Oxidation von Methanol zu Ameisensäure ergibt. Insbesondere verwendeten wir die FDM aus *Pseudomonas putida* F61 (*PpFDM*, rekombinant überexprimiert in *Escherichia coli*).^[11]

Die theoretische Stöchiometrie von zwei Äquivalenten H_2O_2 pro Formeleinheit Methanol konnte experimentell bestätigt werden. Bei Verwendung von 5 mm Methanol wurden in Gegenwart von lediglich *PpAOx* 5 mm (*R*)-1-Phenylethanol gefunden (Abbildung 2, ♦); in Gegenwart von *PpFDM*

verdoppelte sich die Produktmenge auf 10 mm (Abbildung 2, ■), was einer doppelten Oxidation von Methanol entspricht. Darüber hinaus konnte Ameisensäure ($4.50 \pm 0.03 \text{ mM}$) als Koppelprodukt nachgewiesen werden. Es sollte hier jedoch erwähnt werden, dass *PpFDM* eine geringe Formaldehydfinität aufweist ($K_M = 350 \text{ mM}$). Um eine unerwünschte Anreicherung von Formaldehyd zu vermeiden, wurde in den Folgeversuchen eine vergleichsweise hohe *PpFDM*-Konzentration ($0.295 \mu\text{M}$) eingesetzt.

Über die effizientere Nutzung von Methanol hinaus trug *PpFDM* auch zu einer stabileren Gesamtreaktion bei. Wie in Abbildung 1 dargestellt, betrug die Halbwertszeit der enzy-

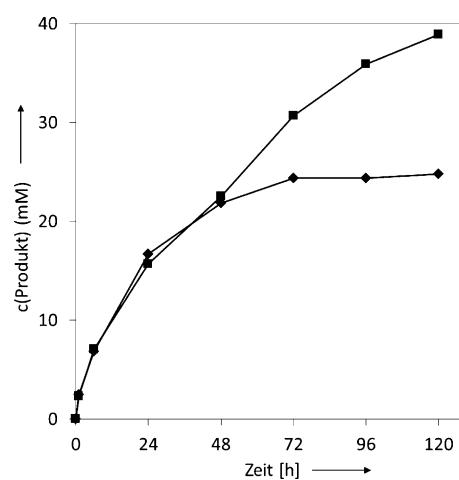


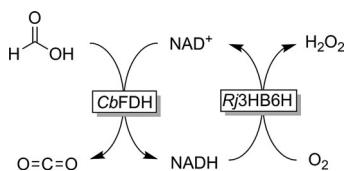
Abbildung 1. Hydroxylierung von Ethylbenzol ohne (♦) und mit (■) *PpFDM*. Reaktionsbedingungen: [*Ethylbenzol*] = 50 mM, [*Methanol*] = 200 mM, [*AaeUPO*] = 100 nM, [*PpAOx*] = 60 nM, [*PpFDM*] = 295 nM in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), $T = 30^\circ\text{C}$. Zur vereinfachten Darstellung sind jeweils beide Produkte ((*R*)-1-Phenylethanol und Acetophenon) zusammengefasst. Weitere Details finden sich im Text.

matischen Hydroxylierung in Abwesenheit der *PpFDM* ca. 36 Stunden (♦), wohingegen in Gegenwart von *PpFDM* für wenigstens 96 Stunden eine beinahe lineare Produktzunahme zu beobachten war (■). Ethylbenzol wurde vollständig zu (*R*)-1-Phenylethanol (31 mM, 62 %) umgesetzt, mit Acetophenon (8 mM, 16 %) als einzigm Nebenprodukt. Die offensichtliche Lücke in der Massenbilanz lässt sich auf partielle Verdunstung des flüchtigen Ethylbenzols zurückführen. Die Verwendung von *PpFDM* führte also zu 40 % mehr Produkt, was sich auch in höheren Wechselzahlen für die hier verwendeten Katalysatoren (TN (AaeUPO und *PpAOx*) stiegen von 291 500 bzw. 485 800 in Abwesenheit von *PpFDM* auf 468 500 bzw. 780 800 in Gegenwart von *PpFDM*) niederschlägt. In Vergleichsexperimenten konnte gezeigt werden, dass insbesondere *PpAOx* stark durch Formaldehyd inhibiert wird, womit sich die Effizienzsteigerung auf eine höhere *PpAOx*-Stabilität zurückführen lässt.

Hier sei darauf hingewiesen, dass sich dieses Reaktionsschema auch leicht auf andere (stereoselektive) Oxyfunktionalisierungen übertragen lässt (Tabelle SI1).

Der abschließende Oxidationsschritt (Ameisensäure zu CO_2) gestaltete sich schwierig. Die verfügbaren Ameisen-

säure-Oxidasen (E.C.1.2.3.1) erwiesen sich als ungeeignet, da ihr pH-Optimum (pH 3–4) nicht mit den hier gewählten Biokatalysatoren kompatibel war.^[12] Als Alternativlösung entschieden wir uns für eine Kombination aus der bekannten Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* (*CbFDH*) und der 3-Hydroxybenzoësäure-6-Hydroxylase aus *Rhodococcus jostii* RHA1 (E.C.1.14.13.24, *Rj3HB6H*; Schema 3).^[13] Dabei



Schema 3. Aerobe Oxidation von Ameisensäure zur H_2O_2 -Bildung durch Kombination der Formiat-Dehydrogenase (*CbFDH*) und der 3-Hydroxybenzoësäure-6-Hydroxylase (*Rj3HB6H*).

katalysiert *CbFDH* den finalen Methanoloxidationsschritt und reduziert gleichzeitig NAD⁺ zu NADH. Die aerobe Reoxidation von NADH zu NAD⁺ (unter Bildung von H_2O_2) wird durch *Rj3HB6H* katalysiert (in Gegenwart des natürlichen Produktes wirkt *Rj3HB6H* als NADH-Oxidase; Schema 3).

In der Tat konnte die angestrebte Gesamtkaskade erfolgreich etabliert werden. Abbildung 2 vergleicht die drei verschiedenen Teilkaskaden: unter Verwendung von lediglich *PpAOx* (◆), *PpAOx* mit *PpFDM* (■) und der Gesamtkaskade (▲). Unter Methanol-begrenzten Reaktionsbedingungen ($c(\text{MeOH}) = 5 \text{ mM}$) wurden, je nach Kaskade, die erwarteten 5, 10 bzw. 15 mM (*R*)-1-Phenylethanol gefunden, was jeweils einer einfachen, doppelten bzw. dreifachen Methanoloxidation entspricht.

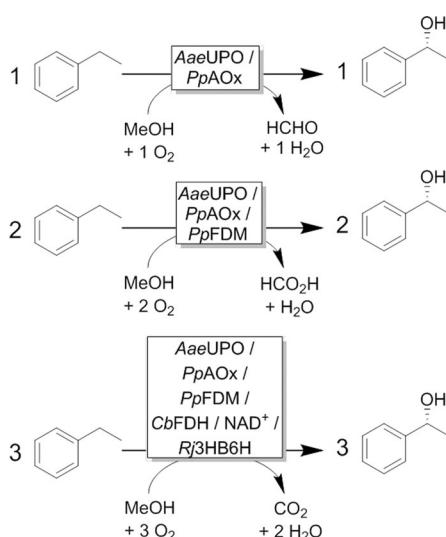


Abbildung 2. Vergleich der verschiedenen Enzymkaskaden zur Oxidation von Methanol für die *AaeUPO*-katalysierte Hydroxylierung von Ethylbenzol. ◆: nur *PpAOx*; ■: *PpAOx* zusammen mit *PpFDM*; ▲: die Gesamtkaskade. Reaktionsbedingungen: [Ethylbenzol] = 15 mM, [Methanol] = 5 mM, [*AaeUPO*] = 50 nM, [*PpAOx*] = 60 nM in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), $T = 30^\circ\text{C}$; ■: [*PpFDM*] = 590 nM; ▲: [*PpFDM*] = 590 nM, [*NAD⁺*] = 1.6 mM, [2,5-Dihydroxybenzoësäure] = 1 mM, [*Rj3HB6H*] = 11 μM , [*CbFDH*] = 1 μM .

Tabelle 1: Katalysatorwechselzahlen der enantioselektiven Hydroxylierung von Ethylbenzol unter vollständiger Methanoloxidation (Abbildung 2, ▲).

Katalysator	TN [mol mol ⁻¹] ^[a]	TF [s ⁻¹] ^[b]
<i>AaeUPO</i>	294 700	41
<i>PpAOx</i>	245 580	34
<i>PpFDM</i>	25 400	3.5
<i>Rj3HB6H</i>	1330	0.18
<i>CbFDH</i>	14 730	2
NAD	9	0.001

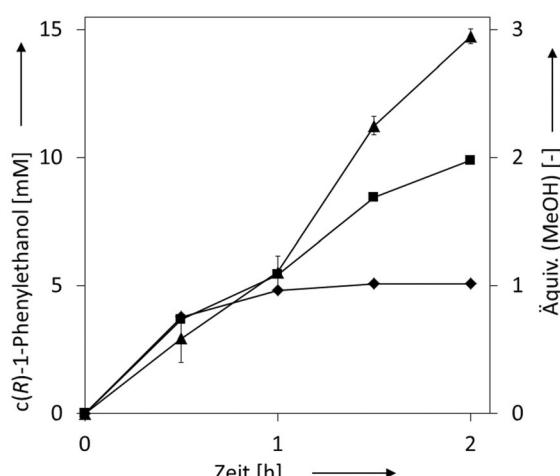
[a] TN = Mol_{Produkt} × Mol_{Katalysator}⁻¹. [b] TF = TN × Reaktionszeit⁻¹ (hier 2 h).

In Tabelle 1 sind die Wechselzahlen der verwendeten Katalysatoren zusammengefasst. Dabei sind die Wechselzahlen der Peroxygenase sowie der Alkohol-Oxidase mit mehreren Hunderttausend bereits so hoch, dass ihr Einsatz zur Synthese von Feinchemikalien (und möglicherweise auch von günstigeren, großvolumigeren Produkten) ökonomisch möglich erscheint.^[14] Nicht zuletzt dank der Disproportionalierung des intermediären Formaldehyds durch *PpFDM* konnten diese hohen Wechselzahlen erreicht werden. Letztere musste allerdings (aufgrund der vorab beschriebenen, niedrigen Affinität zu Formaldehyd) in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt werden, wodurch sich auch die Wechselzahl entsprechend verringert. Auf lange Sicht werden *PpFDM*-Mutanten mit verbesserten kinetischen Eigenschaften unabdingbar sein.

Die hier vorgestellte Kaskade für den dritten Oxidationsschritt (Schema 3) sollte allenfalls als eine temporäre Lösung gesehen werden. Offensichtlich wäre eine einzelne Formiat-Oxidase vorzuziehen. Allerdings waren die uns zugänglichen Enzyme aufgrund ihrer abweichenden optimalen Reaktionsbedingungen nicht für die Gesamtreaktion geeignet. Neue oder optimierte Formiat-Oxidasen mit höheren

Aktivitäten bei neutralen pH-Werten wären sehr wünschenswert! Alternativstrategien wie die Photooxidation von Ameisensäure werden derzeit evaluiert.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Biokatalysatorkonzentrationen in dieser Studie absichtlich niedrig gewählt waren, um eine realistische Abschätzung der erreichbaren Wechselzahlen zu ermöglichen. Folgestudien mit Blick auf höhere Produktivitäten und präparative Anwendungen werden insbesondere



größere Substratmengen und optimierte Begasung untersuchen. Nichtsdestotrotz zeigt diese Studie das enorme Potenzial von Peroxygenasen für Oxyfunktionalisierungen in der organischen Synthese. Um dieses Potenzial auszuschöpfen, bedarf es allerdings effizienter, robuster, skalierbarer und umweltverträglicher In-situ-H₂O₂-Bildungssysteme. Wir sind der Überzeugung, mit der hier vorgestellten Methanol-oxidationskaskade ein solches System etabliert zu haben.

Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch die Europäische Union (KBBE-2013-7-613549, „INDOX“) und die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (AZ 13270). Wir danken Frau Dr. Ö. Erol für tatkräftige Hilfe bei der deutschen Übersetzung.

Stichwörter: Häm-Enzyme · Hydroxylierungen · Oxidationen · Peroxygenasen · Wasserstoffperoxid

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 798–801
Angew. Chem. **2016**, *128*, 809–812

- [1] a) T. Newhouse, P. S. Baran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3362–3374; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3422–3435; b) M. C. White, *Science* **2012**, *335*, 807–809; c) S. R. Neufeldt, M. S. Sanford, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 936–946; d) K. Kamata, K. Yonehara, Y. Nakagawa, K. Uehara, N. Mizuno, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 478–483; e) M. Sun, J. Z. Zhang, P. Putaj, V. Caps, F. Lefebvre, J. Pelletier, J. M. Basset, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 981–1019; f) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496.
- [2] a) S. T. Jung, R. Lauchli, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 809–817; b) E. O'Reilly, V. Kohler, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2490–2501; c) F. E. Zilly, J. P. Acevedo, W. Augustyniak, A. Dege, U. W. Häusig, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2720–2724; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2772–2776; d) S. Kille, F. E. Zilly, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 738–743; e) M. Bordeaux, A. Galarneau, F. Fajula, J. Drone, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2075–2079; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2123–2127.
- [3] a) S. Bormann, A. Gomez Baraibar, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 2038–2052; b) M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 116–125; c) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 554–564.
- [4] D. Holtmann, M. W. Fraaije, D. J. Opperman, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13180–13200.
- [5] M. Hofrichter, R. Ullrich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 276–288.
- [6] a) D. Thiel, D. Doknić, J. Deska, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5278; b) Q. L. Sheng, J. B. Zheng, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1621–1628; c) C. López, A. Cavaco-Paulo, *Eng. Life Sci.* **2008**, *8*, 315–323.
- [7] a) L. Getrey, T. Krieg, F. Hollmann, J. Schrader, D. Holtmann, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1104–1108; b) T. Krieg, S. Huttmann, K.-M. Mangold, J. Schrader, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2686–2689; c) S. Lütz, E. Steckhan, A. Liese, *Electrochim. Commun.* **2004**, *6*, 583–587.
- [8] a) E. Churakova, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCat-Chem* **2013**, *5*, 565–568; b) E. Churakova, M. Kluge, R. Ullrich, I. Arends, M. Hofrichter, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10716–10719; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10904–10907; c) D. I. Perez, M. Mifsud Grau, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2009**, 6848–6850; d) S. Gargiulo, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 338–342.
- [9] a) F. Pezzotti, M. Therisod, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 701–704; b) F. Pezzotti, K. Okrasa, M. Therisod, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2681–2683.
- [10] a) S. Peter, A. Karich, R. Ullrich, G. Grobe, K. Scheibner, M. Hofrichter, *J. Mol. Catal. B* **2014**, *103*, 47–51; b) P. Molina-Espeja, E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, R. Ullrich, M. Hofrichter, M. Alcalde, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3496–3507; c) X. Wang, S. Peter, R. Ullrich, M. Hofrichter, J. T. Groves, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9238–9241; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9408–9411; d) K. Piontek, E. Strittmatter, R. Ullrich, G. Gröbe, M. J. Pecyna, M. Kluge, K. Scheibner, M. Hofrichter, D. A. Plattner, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 34767–34776; e) M. Kluge, R. Ullrich, K. Scheibner, M. Hofrichter, *Green Chem.* **2012**, *14*, 440–446; f) R. Ullrich, M. Hofrichter, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6247–6250; g) R. Ullrich, J. Nüske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4575–4581.
- [11] a) H. Yanase, K. Moriya, N. Mukai, Y. Kawata, K. Okamoto, N. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 85–91; b) N. Kato, S. Mizuno, Y. Imada, C. Sakazawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *27*, 567–571; c) N. Kato, H. Kobayashi, M. Shimao, C. Sakazawa, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2017–2023; d) N. Kato, K. Shirakawa, H. Kobayashi, C. Sakazawa, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 39–46.
- [12] A. Chang, M. Scheer, A. Grote, I. Schomburg, D. Schomburg, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D588–D592.
- [13] a) J. Sucharitakul, C. Tongsook, D. Pakotiprapha, W. J. H. van Berkel, P. Chaiyen, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35210–35221; b) S. Montersino, W. J. H. van Berkel, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2012**, *1824*, 433–442.
- [14] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 266–274.

Eingegangen am 23. August 2015

Online veröffentlicht am 26. November 2015