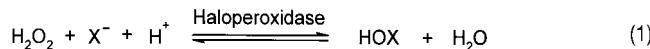


## Metallfreie Haloperoxidasen: Fakt oder Artefakt?

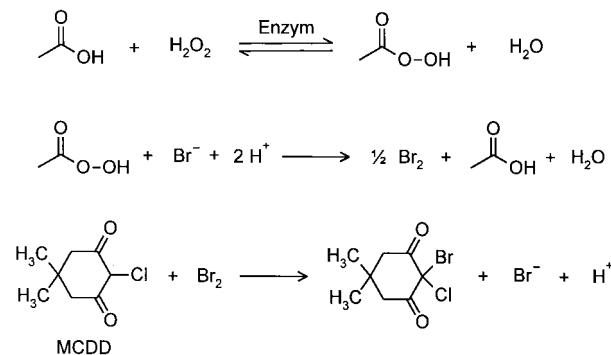
Ole Kirk\* und Lars Sparre Conrad

Haloperoxidasen sind Enzyme, die die Oxidation von Halogenid-Ionen ( $X^-$ ) zur entsprechenden hypohalogenigen Säure ( $HOX$ ) katalysieren [Gl. (1)]. Diese kann mit nucleo-



philen Acceptoren zu einer Vielzahl halogenierter Verbindungen reagieren.<sup>[1, 2]</sup> Es wurden mehrere Klassen von Haloperoxidasen identifiziert. Zwei davon tragen eine prosthetische Gruppe: eine Häm-Gruppe im Fall der Eisenhaltigen und ein Vanadat-Ion ( $VO_4^{3-}$ ) im Fall der Vanadiumhaltigen Haloperoxidasen.<sup>[1, 3]</sup>

Über eine dritte Klasse von Haloperoxidasen, die sogenannten metallfreien Haloperoxidasen, berichteten van Pee et. al.<sup>[4]</sup> Der Mechanismus dieser Haloperoxidasen war unbekannt; als Hypothese wurde die Bildung eines Methionin-Sulfoxids als Zwischenstufe am aktiven Zentrum angenommen.<sup>[5]</sup> Daher war es sehr überraschend, daß durch eine Kristallstrukturanalyse bei einer metallfreien Bromperoxidase<sup>[6]</sup> eine katalytische Triade (Ser-His-Asp) nachgewiesen wurde, die üblicherweise in Lipasen, Esterasen und Serinproteasen vorkommt.<sup>[7]</sup> Diese Enzyme sind nur in einem Acetatpuffer aktiv. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache schlügen Berkessel, Krauss, van Pee und Mitarbeiter einen Mechanismus vor,<sup>[8]</sup> nach dem die Halogenierung von Monochlordimedon (2-Chlor-5,5-dimethylcyclohexa-1,3-dion; MCDD) in Gegenwart von Acetat,  $H_2O_2$ ,  $Br^-$  und des Enzyms gemäß der in Schema 1 gezeigten Sequenz angenommen wird.



Schema 1. Mechanismus der Halogenierung von MCDD, die durch eine „metallfreie Haloperoxidase“ katalysiert wird. Die dabei beteiligte Peressigsäure liegt in einer niedrigen stationären Konzentration vor und wird durch Perhydrolyse von Essigsäure gebildet.<sup>[8]</sup>

[\*] Dr. O. Kirk

Department of Bio-Organic Chemistry  
Enzyme Research, Novo Nordisk A/S  
Novo Alle, DK-2880 Bagsvaerd (Dänemark)  
Fax: (+45) 4442-3206  
E-mail: oki@novo.dk

Dr. L. Sparre Conrad  
Department of Formulation Design  
Enzyme Development and Application, Novo Nordisk A/S  
Novo Alle, DK-2880 Bagsvaerd (Dänemark)

Der Enzym-katalysierte Schritt ist die Perhydrolyse (d.h. die Spaltung mit Wasserstoffperoxid) von Essigsäure unter Bildung von Peressigsäure. Leider konnten die Autoren bei ihren Untersuchungen keine Peressigsäure nachweisen, da Ihnen keine ausreichend empfindliche Analytik zur Verfügung stand. Ein indirekter Beweis wurde aber erbracht, als sich herausstellte, daß die metallfreie Haloperoxidase, die neben einer Esterase-Aktivität gegenüber 4-Nitrophenylacetat auch Lösungen von zuvor gebildeter Peressigsäure abbaut. Vier Proteasen sowie eine Cholinesterase wurden von den Autoren unter gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls hinsichtlich einer Haloperoxidase-Aktivität untersucht. Nur die Cholinesterase gab eine positive Reaktion. Daraus wurde gefolgt, daß die Fähigkeit zur Katalyse der Perhydrolyse keine allgemeine Eigenschaft von Enzymen ist, deren Mechanismus auf der katalytischen Triade Ser-His-Asp beruht, und daß ein neuartiges Enzymsystem gefunden worden war.

Wir berichteten bereits über ein hochempfindliches Verfahren zum Nachweis von Peroxsäuren in komplexen Gemischen auf der Basis von HPLC mit elektrochemischer Detektion.<sup>[9]</sup> Dieses Verfahren wurde auch dazu genutzt, verschiedene Hydrolasen auf ihre Fähigkeit zum Auf- und Abbau von Peroxsäuren zu untersuchen.<sup>[10]</sup> Diesen Ergebnissen zufolge können verschiedene Hydrolasen, die die Triade Ser-His-Asp enthalten, die Perhydrolyse in Frage kommender Substrate katalysieren. So katalysieren Lipasen die Perhydrolyse von Fettsäuren, wogegen nur Esterasen einschließlich der Cholinesterase die Perhydrolyse von Essigsäure katalysieren. Diese Ergebnisse widersprechen der Annahme von Berkessel et al., nach der die Fähigkeit zur Katalyse der Perhydrolyse eine ungewöhnliche Aktivität ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob Lipasen, eine andere Klasse von Enzymen, unter den von Berkessel et al. angegebenen Versuchsbedingungen generell in der Lage sind, eine positive Haloperoxidase-Aktivität zu entwickeln. Sollte dies der Fall sein, sollte geprüft werden, ob wie erwartet im Verlauf der Reaktion Peroxsäuren gebildet werden.

Wie bereits erwähnt, hatten wir festgestellt, daß Lipasen die Perhydrolyse langkettiger Acylsubstrate katalysieren können. Zur Anpassung der Versuchsbedingungen von Berkessel et al. wurde der 1M Acetatpuffer durch einen Hexanoatpuffer ersetzt. Dessen Konzentration konnte wegen der begrenzten Löslichkeit von Hexansäure nur 0.2M betragen. Drei Lipasen aus *Fusarium oxysporum*, *Humicola lanuginosa* und *Candida antarctica* (B-Komponente) wurden für die Untersuchung ausgewählt. Wie aus Abbildung 1 zu ersichtlich, gaben die

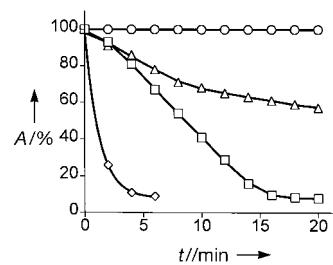


Abbildung 1. Zeitlicher Verlauf der Lipase-katalysierten Halogenierung von MCDD. ○ Vergleich, □ 100 μM zuvor gebildete Peroxsäure, △ Lipase aus *Fusarium*, ▲ Lipase aus *Humicola*.

Lipasen aus *Fusarium* und *Humicola* ein positive Haloperoxidase-Reaktion, die als Bromierung von MCDD gemessen wurde. Die Lipase aus *Fusarium* erwies sich unter den Versuchsbedingungen als stabil und war in der Lage, die gesamte MCDD-Menge umzuwandeln. Dagegen war bei der Lipase aus *Humicola* die  $A_{290}$ -Kurve nur während etwa 7 min linear. Die Daten nach dieser Zeit sprechen für eine Inaktivierung des Enzyms. Für die Lipase aus *Candida* wurden leider keine eindeutigen Daten erhalten, da stark UV-absorbierende Verunreinigungen des Enzympräparats zu einer Störung der Detektion führten. Alle Lipasen konnten aber unter den Versuchsbedingungen die Bildung von Peroxyhexansäure katalysieren, wenngleich die Konzentrationen wie erwartet sehr niedrig waren (Tabelle 1).

Tabelle 1. Durch verschiedene Lipasen katalysierte Bildung von Peroxyhexansäure.

Lipase	$H_2O_2$ [mM]	$c(\text{Peroxyhexansäure})^{[a]}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<i>Fusarium oxysporum</i>	250	372
	50	128
	7.2	17
<i>Humicola lanuginosa</i>	250	194
<i>Candida antarctica B</i> (ohne Enzym)	250	147
	250	0

[a] Nach 15 min.

Wie bereits aus den Versuchen zur Verfolgung der Halogenierung von MCDD erwartet, war die Lipase aus *Fusarium* der aus *Humicola* überlegen, gemessen an der Peroxsäureproduktion nach 15 min. Bei der Lipase aus *Fusarium* wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Wasserstoffperoxid untersucht. Es wurde ein eindeutiger Dosis-Wirkungs-Effekt festgestellt. Die Gleichgewichtskonzentration von nur  $17\mu\text{M}$  unter den Halogenierungsbedingungen von MCDD sollte aber genügend hoch sein für die Umsetzung von MCDD, da dieses Substrat nur in einer Konzentration von  $44\mu\text{M}$  vorlag.

Um die Hypothese weiter zu stützen, daß die gebildete Peroxsäure tatsächlich für die festgestellte Halogenierung von MCDD verantwortlich war, wurde bei Versuchen ohne Enzyme zuvor gebildete Peroxsäure zugesetzt. Wie in Abbildung 1 deutlich wird, führte die Zugabe von  $100\mu\text{M}$  zuvor gebildeter Peroxsäure wie erwartet zu einer sehr schnellen Halogenierung von MCDD. Schließlich wurden die auf Lipase beruhenden Systeme mit einer Vanadium-haltigen Haloperoxidase mikrobieller Herkunft (*Curvularia verruculosa*) verglichen.<sup>[11]</sup> Die Zugabe dieses Enzyms in einer Konzentration von  $0.4\mu\text{g mL}^{-1}$  führte sowohl im Hexanoat- als auch im Phosphatpuffer (Ergebnisse nicht gezeigt) nach weniger als 2 min zur vollständigen Halogenierung von MCDD. Erwartungsgemäß konnte keine Peroxsäure bei Versuchen im Hexanoatpuffer nachgewiesen werden. Diese Versuche unterstreichen den Unterschied zwischen echter Haloperoxidase-Aktivität und der Aktivität einer scheinbar metallfreien Haloperoxidase, die von einer Hydrolase ausgeht.

Nach unseren Untersuchungen können Lipasen auch die Aktivität einer metallfreien Haloperoxidase entwickeln, wenn ein Acyl-Substrat, Wasserstoffperoxid und Halogenid-

Ionen zugegen sind. Die Bildung einer Peroxsäure, die in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, führte offenbar zu dieser scheinbaren Haloperoxidase-Aktivität. Daher betrachten wir die als einzigartig postulierte enzymatische Aktivität metallfreier Haloperoxidases<sup>[8]</sup> als eine gewöhnliche Nebenaktivität von Hydrolasen wie Lipasen und Esterasen.

### Experimentelles

Allgemeines: Die Lipasen aus *Fusarium oxysporum*, *Humicola lanuginosa* und *Candida antarctica* stammen von Novo Nordisk A/S (Dänemark) und wurden wie bereits beschrieben charakterisiert.<sup>[10]</sup> Die Haloperoxidase aus *Curvularia verruculosa* stammt ebenfalls von Novo Nordisk A/S und wurde nach der Methode von Fuglsang et al. präpariert.<sup>[11]</sup> MCDD und KBr stammen von Sigma;  $H_2O_2$  und die übrigen Chemikalien (alle analysenrein) von Merck. Vergleichsproben von Peroxyoctan- und Peroxyhexansäure wurde nach bekannten Verfahren durch Oxidation der entsprechenden Carbonsäure mit  $H_2O_2$  unter saurer<sup>[12]</sup> bzw. Lipase-Katalyse<sup>[13]</sup> hergestellt.

Assay zur Bestimmung der Haloperoxidase-Aktivität: Die Versuche wurden nach Lit. [8] durchgeführt. Anstelle des 1M Acetatpuffers wurde ein 0.2M Hexanoatpuffer (pH 5.5) verwendet. Ein typisches Experiment wurde gestartet durch die Zugabe von  $100\text{ LU mL}^{-1}$  (LU = lipase unit; 1 LU entspricht der Menge an Lipase, die aus Tributyrin unter Standardbedingungen 1  $\mu\text{mol}$  Fettsäure freisetzt. Eine detaillierte Beschreibung des Assays ist bei Novo Nordisk A/S unter AF 95/5 erhältlich) Lipase zu einer Testlösung, die MCDD ( $44\mu\text{M}$ ),  $H_2O_2$  ( $7.2\text{ mM}$ ) und KBr ( $82\text{ mM}$ ) in Hexanoatpuffer ( $25^\circ\text{C}$ ) enthielt. Der Reaktionsverlauf wurde spektrophotometrisch verfolgt; die Halogenierung von MCDD äußerte sich in der Abnahme der Absorbanz bei  $290\text{ nm}$ .

HPLC-Assay zum Nachweis der Bildung von Peroxsäure: Der Assay wurde wie bereits beschrieben<sup>[9]</sup> HPLC-chromatographisch mit elektrochemischer Detektion durchgeführt (Umkehrphasen-Säule LiChrosorb RP-18 (Merck), mobile Phase: 20 mM Phosphatpuffer (pH 6) und Methanol (50:50, v/v)). Da bereits bekannt war, daß die Detektion verschiedener Peroxsäuren unabhängig von deren Kettenlänge ist,<sup>[9]</sup> wurde der Assay mit Peroxyoctansäure geeicht, die in hochreiner, kristalliner Form zugänglich war. Peroxyhexansäure diente als Referenzprobe zur Feststellung der Retentionszeit. Die Versuche wurden wie oben durchgeführt, wobei lediglich die Konzentration an  $H_2O_2$  verändert wurde (Tabelle 1) und weder MCDD noch KBr zugegeben wurden. Da bei sehr hohen Salzkonzentrationen Interferenzen mit dem elektrochemischen Detektor auftraten, wurden die Proben mit Hexan extrahiert (eine Probe von 2 mL wurde mit 1 mL Hexan extrahiert), und 100  $\mu\text{L}$  der Hexanphase wurden dann vor der Analyse in 400  $\mu\text{L}$  mobiler Phase verdünnt. Bei allen Versuchen wurde die Bildung von Peroxyhexansäure zu Beginn und nach 15 min aufgezeichnet.

Eingegangen am 24. August 1998 [Z 12324]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 977–979

**Stichwörter:** Enzymkatalyse • Esterasen • Haloperoxidasen • Lipasen • Peroxsäuren

- [1] M. C. R. Franssen, H. C. van der Plas, *Adv. Appl. Microbiol.* **1992**, *37*, 41–99.
- [2] A. Butler, J. V. Walker, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1937–1944.
- [3] A. Messerschmidt, L. Prade, R. Wever, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 309–315.
- [4] a) K.-H. van Pee, G. Sury, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1987**, *368*, 1225–1232; b) W. Wiesner, K.-H. van Pee, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 13725–13732.
- [5] T. Haag, F. Lingens, K.-H. van Pee, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1550–1552; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1487–1488.
- [6] H. J. Hecht, H. Sobek, T. Haag, O. Pfifer, K.-H. van Pee, *Struct. Biol.* **1994**, *1*, 532–537.

- [7] a) C. W. Wharton in *Comprehensive Biological Catalysis, Vol. 1* (Hrsg.: M. Sinnott), Academic Press, London, **1998**, S. 345–379; b) D. M. Quinn, S. R. Feaster in *Comprehensive Biological Catalysis, Vol. 1* (Hrsg.: M. Sinnott), Academic Press, London, **1998**, S. 455–479.
- [8] M. Picard, J. Gross, E. Lübbert, S. Tölzer, S. Krauss, K.-H. van Pee, A. Berkessel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1245–1248; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1196–1199.
- [9] O. Kirk, T. Damhus, M. W. Christensen, *J. Chromatogr.* **1992**, *606*, 49–53.
- [10] O. Kirk, M. W. Christensen, T. Damhus, S. E. Godtfredsen, *Bio-catalysis* **1994**, *11*, 65–77.
- [11] C. Fuglsang, K. Oxenboll, T. Halkier, R. M. Berka, J. Cherry (Novo Nordisk A/S), WO-A 98/04102, **1995** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 196836].
- [12] W. E. Parker, C. Ricciuti, C. L. Ogg, D. Swern, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4037–4041.
- [13] F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587–4592.

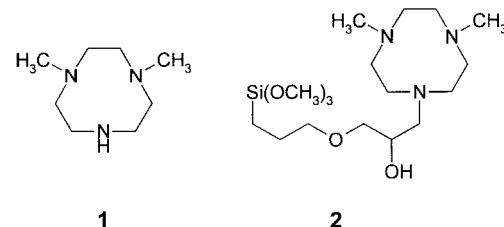
## Selektive Alkenoxidation mit $H_2O_2$ und einem heterogenisierten Mn-Katalysator: Epoxidierung und ein neuer Zugang zu vicinalen *cis*-Diolen\*\*

Dirk E. De Vos, Stefaan de Wildeman, Bert F. Sels, Piet J. Grobet und Pierre A. Jacobs\*

Die selektive Oxidation von Olefinen liefert wertvolle Synthesewischenstufen wie Epoxide und *cis*-Diole.<sup>[1]</sup> Großtechnische Epoxidierungen werden häufig mit stöchiometrischen Mengen an Reagentien durchgeführt (Persäuren, Payne-Verfahren).<sup>[2]</sup> Die *cis*-Dihydroxylierung wird wegen des Preises und der Toxizität der hierfür üblichen Os-Katalysatoren derzeit nicht in großem Maßstab angewendet.<sup>[3]</sup> Die Forschungsziele für die katalytische Oxidation lauten: 1) Einsatz von  $H_2O_2$  statt organischer Sauerstoffdonen, 2) Vermeidung von Verunreinigungen mit Halogeniden oder toxischen Metallen, z. B. durch Verwendung heterogenisierter Reagentien, und 3) Erzeugung stabiler Produkte bei z. B. annähernd neutralem pH-Wert, um die Epoxide zu schützen. Trotz der beeindruckenden Fortschritte auf diesem Gebiet erfüllen, wenn überhaupt, nur wenige katalytische Systeme alle diese Bedingungen.<sup>[4]</sup> Die Katalyse mit Komplexen aus Mangan und cyclischen Triaminen wie 1,4,7-Trimethyl-1,4,7-triazacyclonanon (tmtacn) ist seit kurzem eine echte Alternative zu den bekannten, durch homogene

Mangankomplexe vermittelten Umsetzungen.<sup>[5–8]</sup> So lässt sich z. B. das instabile Diepoxybutan aus  $H_2O_2$  und Butadienmonoxid mit einem Mn-tmtacn-Oxalat-Katalysator in 80 % Ausbeute herstellen (>90 % Selektivität, 530 Mn-Zyklen).<sup>[7]</sup>

Wir beschreiben hier das erste auf zufriedenstellende Weise heterogenisierte Äquivalent dieser neuen Art von Sauerstoff-Transfer-Katalysatoren. Ein wichtiges Element bei der Herstellung dieses Katalysators ist der Einsatz des asymmetrisch substituierten Liganden 1,4-Dimethyl-1,4,7-triazacyclonanon (dmtacn) **1**. Dieses Molekül hat außer den auch in tmtacn vorhandenen  $CH_3$ -Substituenten auch eine sekundäre Aminogruppe, an der eine kovalente Bindung geknüpft werden



**1**

**2**

kann. Der neue heterogenisierte Mn-Katalysator hat auch für  $\alpha$ -Olefine eine hohe Aktivität und Epoxid-Selektivität (bis zu 90 %, siehe Tabelle 1). Bei disubstituierten Olefinen liefert die Reaktion (neben dem Epoxid) eine beträchtliche Menge des *cis*-Diols (10–60 Mol *cis*-Diol pro Mol Mn). Damit liegt die erste Mn-katalysierte *cis*-Dihydroxylierung vor.

Der Cyclus **1** wurde durch selektive Detosylierung von tritosyliertem 1,4,7-Triazacyclonanon (tacn), Methylierung des monotosylierten tacn und Detosylierung in  $H_2SO_4$  hergestellt.<sup>[9]</sup> Das freie Amin wurde als leicht gelbes Öl erhalten, das dem  $^1H$ -NMR-Spektrum nach rein war. Zum Vergleich von dimethyliertem dmtacn mit trimethyliertem tmtacn wurden Experimente zur homogenen Katalyse durchgeführt mit Komplexen, die *in situ* aus  $MnSO_4 \cdot H_2O$  und dmtacn hergestellt wurden. Als Testreaktion diente die Oxidation von Styrol und 1-Hexen in Aceton und Acetonitril (Tabelle 1, Nr. 1). Während die Epoxidierung von Styrol mit Mn-dmtacn in Aceton und die Reaktion mit Mn-tmtacn ähnlich waren,<sup>[6a]</sup> war das homogene Mn-dmtacn in Acetonitril bei der Epoxidierung von 1-Hexen nahezu inaktiv. In diesem Fall war das Epoxidierungsausmaß verschwindend gering, verglichen mit der Peroxidzersetzung, die über zweikernige Spezies verläuft.<sup>[10]</sup>

Zur Verknüpfung von dmtacn mit einem festen Träger wurden verschiedene Ansätze verfolgt: 1) Reaktion von dmtacn mit kommerziell erhältlichem 3-chlorpropyliertem Kieselgel und  $Et_3N$  ( $\rightarrow$ Sil-p-dmtacn); 2) Glycidylierung eines mesoporösen Siliciumdioxids (MCM-41)<sup>[11]</sup> oder eines amorph ausgefällten Siliciumdioxids mit (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxsilan und anschließende Addition von dmtacn ( $\rightarrow$ MCM-41-gp-dmtacn, Sil-gp-dmtacn); und 3) eine „umgekehrte“ Synthese, in der dmtacn zuerst mit (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxsilan behandelt und das entstehende Silylierungsagens **2** dann an einer amorphen  $SiO_2$ -Oberfläche immobilisiert wird ( $\rightarrow$ dmtacn-gp-Sil). Die Oberflächenbeladungen mit dem Liganden liegen bei diesen Verfahren zwischen 0.2 und 0.8 mmol g<sup>-1</sup>. Die Oberflächengruppen wurden durch Festkörper- $^{13}C$ -NMR-Spektroskopie auf das Vorliegen von dmtacn-gp-Sil untersucht. Für ein glycidyliertes Material und für ein

[\*] Prof. Dr. P. A. Jacobs, Prof. Dr. D. E. De Vos, S. De Wildeman, Dr. B. F. Sels, Prof. Dr. P. J. Grobet  
Center for Surface Chemistry  
Katholieke Universiteit Leuven  
Kardinaal Mercierlaan 92, B-3001 Heverlee (Belgien)  
Fax: (+32) 16-321-998  
E-mail: pierre.jacobs@agr.kuleuven.ac.be

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der belgischen Regierung im Rahmen eines IUAP-Projekts zur supramolekularen Katalyse unterstützt. Wir danken der FWO (D.E.D.V., P.J.G.) und IWT (B.F.S.) für Forschungsstipendien.