

Formation and metabolism of quinones in the biodegradation of lignin model compounds by *Phanerochaete chrysosporium*

Doctoral Thesis

Author(s):

Tuor, Urs Martin

Publication date:

1992

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000667013>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH No.9806

**Formation and Metabolism of Quinones
in the Biodegradation of Lignin Model Compounds
by *Phanerochaete chrysosporium***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
URS MARTIN TUOR
dipl. chem. Universität Zürich
born October 24, 1960
citizen of Sumvitg GR and Zürich

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. Fiechter, examiner
Prof. Dr. K.H. Winterhalter, co-examiner
Dr. H.E. Schoemaker, co-examiner

Zürich 1992

SUMMARY

Ligninolytic cultures of *P. chrysosporium* degrade about 50% of added phenolic model compounds (with both α -hydroxyl or α -carbonyl substituent) within 24 hours. Peroxidases isolated from such cultures degrade lignin model compounds by oxidative cleavage reactions. The results strongly suggest quinones and hydroquinones to be key intermediates in the oxidative biodegradation of lignin model compounds.

Homogeneous manganese peroxidase (MnP) oxidizes 1-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxymethyl-2-methoxyphenoxy)-1,3-dihydroxypropane, a phenolic, dimeric β -O-4 model compound, in the presence of Mn^{II} and H_2O_2 . C_α -oxidation of the substrate is the predominant reaction. Alkyl-phenyl cleavage and C_α - C_β -cleavage yielding quinones and hydroquinones among other products are minor reaction pathways. MnP then cleaves the initial C_α -oxidation product via alkyl-phenyl cleavage and C_α - C_β -cleavage, yielding mainly quinones and hydroquinones. Synthetically prepared Mn^{III} -malonate complex also catalyzes these reactions. ^{18}O -tracer experiments using $H_2^{18}O$ under argon show incorporation of one atom of ^{18}O into the quinone and the hydroquinone formed from the α -hydroxy substrate by alkyl-phenyl cleavage. In addition, incorporation of one oxygen atom from $H_2^{18}O$ into the products formed from alkyl-phenyl cleavage and C_α - C_β -cleavage is observed in the enzymatic oxidation of the C_α -carbonyl substrate. No incorporation of labeled oxygen into any of the products occurs when the oxidation is performed under $^{18}O_2$.

Apparently one electron oxidation of the substrates by enzyme-generated Mn^{III} produces a phenoxy radical. The intermediate products can either undergo radical cleavage or be further oxidized by Mn^{III} to the substrate cyclohexadienyl cation. The formation of the observed products is explained by subsequent non-enzymatic rearrangement or C-C-bond cleavage reactions.

The origin of oxygen in quinones formed during enzymatic oxidation of veratryl alcohol (3,4-dimethoxybenzyl alcohol) by lignin peroxidase (LiP) was also studied by means of ^{18}O -tracer experiments. One oxygen atom stems from water and one from dioxygen. A detailed reaction mechanism accounting for the incorporation rates is presented, and the incorporation molecular oxygen is explained on the basis of oxygen activation processes.

The metabolism of quinones formed in the enzymatic oxidation of veratryl alcohol and its methyl ether was studied in ligninolytic cultures of *P. chrysosporium*. The metabolites have been isolated, purified and their chemical structure elucidated. They are most probably intracellularly reduced to the corresponding hydroquinones and subsequently metabolized to formally reduced hydroquinones. Furthermore, the metabolism of the para-quinone formed in the enzymatic oxidation of the phenolic model compound by MnP has been investigated. Again, the substrate is first reduced to the corresponding hydroquinone. The further metabolism very likely proceeds via an enzymatic transmethylation reaction yielding a substituted ortho-hydroquinone, which, after an additional oxidation and reduction cycle, could be ring-cleaved by an dioxygenase.

The relevance of the results obtained with lignin model compounds is discussed with regard to established concepts on lignin biodegradation. It is argued that oxidative cleavage of phenolic C_α-carbonyl residues by MnP might be an important process of lignin biodegradation, particularly during the primary attack of lignin. The importance of reductive conversions, especially the reduction of quinones, for lignin biodegradation is emphasized.

ZUSAMMENFASSUNG

Ligninolytische Kulturen des Weissfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium* bauen phenolische, sowohl α -Hydroxyl- oder α -Carbonyl-substituierte Modellverbindungen innerhalb von 24 h zu ungefähr 50% ab. Aus diesen Kulturen isolierte Peroxidasen bauen Lignin-Modellverbindungen mittels oxidativer Spaltungsreaktionen ab. Die Resultate weisen darauf hin, dass Chinone und Hydrochinone zentrale Zwischenprodukte des oxidativen biologischen Abbaus von Lignin-Modellverbindungen sind.

Homogene Mangan-abhängige Peroxidase (MnP) oxidiert 1-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxymethyl-2-methoxyphenoxy)-1,3-dihydroxypropan, eine phenolische, dimere β -O-4 Lignin-Modellverbindung in Gegenwart von Mn^{II} und H_2O_2 unter C_α -Oxidation des Substrates als Hauptreaktion. Alkyl-phenyl-Spaltung und C_α - C_β -Spaltung unter Bildung von Chinonen und Hydrochinonen wurden als Nebenreaktionen beobachtet. Oxidative Spaltung des Produktes der C_α -Oxidation durch MnP führt zur Bildung von Chinonen und Hydrochinonen als Hauptprodukte. Synthetisch hergestellter Mn^{III} -Malonat-Komplex katalysiert die selben Reaktionen. Markierungsversuche mit ^{18}O -markiertem H_2O unter Argon erwiesen den Einbau von einem Atom Sauerstoff aus H_2O in das Chinon und Hydrochinon, die durch Alkyl-phenyl-Spaltung des C_α -Hydroxyl-Substrates gebildet wurden. Ebenso erfolgt Einbau von markiertem Sauerstoff aus H_2O in die Produkte, welche bei der enzymatischen Oxidation des C_α -Carbonyl-Substrates mit anschliessender Alkyl-phenyl-Spaltung und C_α - C_β -Spaltung gebildet werden. Ein Einbau von markiertem Sauerstoff aus ^{18}O -markiertem Sauerstoff wird bei beiden Substraten nicht beobachtet.

Diese Resultate werden anhand von Reaktionsmechanismen erklärt, die auf einer Ein-Elektron-Oxidation der Substrate unter Bildung von Phenoxy-Radikalen durch enzymatisch erzeugte Mn^{III} -Ionen beruhen. Diese Zwischenprodukte gehen entweder radikalische Spaltungsreaktionen ein oder werden durch Mn^{III} zu den entsprechenden Substrat-Cyclohexadienyl-Kationen oxidiert. Nicht-enzymatische Umlagerungsreaktionen oder Spaltung von C-C-Bindungen führen zu den beobachteten Produkten. Die Herkunft von Sauerstoff, der im Laufe der enzymatischen Oxidation von Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxy-benzylalkohol) durch LiP in die dabei gebildeten Chinone eingebaut wird, konnte ebenfalls mittels ^{18}O -Markierungsversuchen abgeklärt werden. Je ein Sauerstoffatom stammt von Wasser und von molekularem Sauerstoff. Zur Erklärung der beobachteten

Einbauration wird ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, wobei die Reaktion des molekularen Sauerstoffs auf einer Sauerstoff-Aktivierung beruht.

Der Metabolismus der Chinone, welche von Veratrylalkohol und dessen Methylether im Laufe der enzymatischen Oxidation durch LiP gebildet werden, wurde in ligninolytischen Kulturen von *P. chrysosporium* untersucht. Die Metaboliten wurden isoliert, gereinigt und deren chemische Struktur aufgeklärt. Die Substrate werden über höchstwahrscheinlich intrazelluläre Reduktion zu Hydroquinonen und weiter zu Metaboliten abgebaut, die formal als reduzierte Hydroquinone beschrieben werden können. Der Abbau des para-Chinons, welches durch enzymatische Oxidation der phenolischen β -O-4 Modellverbindung durch MnP gebildet wird, wurde ebenfalls untersucht. Wiederum erfolgt als erstes Reduktion zum entsprechenden p-Hydrochinon. Der weitere Abbau erfolgt wahrscheinlich über eine enzymatische Transmethylierung zu einem methoxy-substituierten Katechol.

Die Relevanz der vorliegenden, mit Lignin-Modellverbindungen erhaltenen Resultate wird mit Bezug auf vorliegende Konzepte des Ligninabbaus diskutiert. Insbesondere die oxidative Spaltung von phenolischen C_{α} -Carbonyl-Untereinheiten durch MnP dürfte für den biologischen Abbau von Lignin und speziell für den Primärangriff des Lignins von Bedeutung sein. Die Bedeutung von reduktiven Vorgängen, vor allem der Reduktion von Chinonen im Rahmen des Lignin-Abbaus wird herausgearbeitet.