

Bakterielle Acyltransferasen als Alternative für lipasekatalysierte Acylierungen zur Produktion von Oleochemikalien und Brennstoffen

Tim Stöveken und Alexander Steinbüchel*

Acyltransferasen · Biosynthese · Biotechnologie · Enzyme · Lipide

Bakterielle Acyltransferasen bilden eine neue Enzymklasse, als deren erstes Mitglied die WS/DGAT in *Acinetobacter baylyi* ADP1 identifiziert wurde. Ihre geringe Spezifität wurde für zahlreiche biotechnologische Anwendungen zur Lipidmodifizierung genutzt, ein Gebiet, auf dem bisher hauptsächlich Lipasen Verwendung finden. Beispiele sind die Biosynthesen von Jojoba-ähnlichen Wachsestern und von Fettsäureethylestern. Darüber hinaus lassen sich mit diesen Enzymen Acylthioester synthetisieren. Acyltransferasen sind eine mögliche Alternative zu Lipasen. Mit ihnen können Acyloxoester und Acylthioester statt durch In-vitro-Katalyse im Enzymreaktor *in vivo* durch Ganzzellkatalyse hergestellt werden. In diesem Kurzaufsatze beleuchten wir die biotechnologische Verwendung der Acyltransferasen für die Produktion von modifizierten Lipiden, ausgehend von erneuerbaren Rohstoffen.

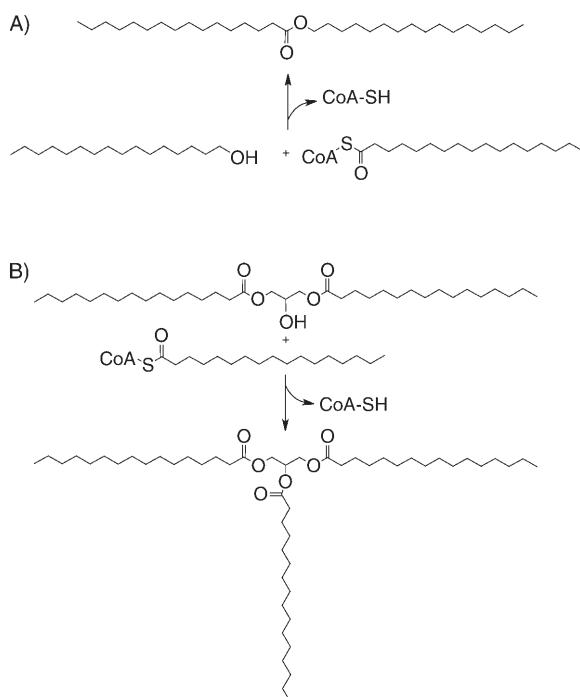
1. Einleitung

In Prokaryoten sind Polyhydroxyalkansäuren (PHAs) die am weitesten verbreiteten und am besten untersuchten Speicherstoffe.^[1,2] Sie bilden eine sehr heterogene Klasse von Polyester, mit über 150 verschiedenen Hydroxyalkansäure-Bestandteilen. Seit kurzem wächst das Interesse an weiteren intrazellulären Speicherstoffen wie Cyanophycin, Triacylglyceriden (TAGs) und Wachsestern (WEs).^[3] TAGs und WEs wirken in Bakterien als Kohlenstoff- und Energiespeicher. Vor allem WEs sind in der Gattung *Acinetobacter* weit verbreitet.^[4–7] In einigen Fällen wurde die WE-Speicherung auch für Mitglieder der Gattung *Moraxella* und *Micrococcus* beschrieben.^[8,9] In letzter Zeit wurden immer mehr Beispiele für Wachsester speichernde Bakterien innerhalb der Gruppe der Alkan abbauenden Mikroorganismen, wie *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Alcanivorax jadensis*, *Alcanivorax*

borkumensis und *Thalassolituus oleivorans*, beschrieben.^[10,11] Diese Öl abbauenden Bakterien sind auf den Abbau von Kohlenwasserstoffen spezialisiert.^[10–12] Eine Besonderheit dieser Bakterien, vor allem von *A. borkumensis*, ist ihre Fähigkeit, lange Hungerzeiten zu überdauern und sich anschließend in mit Öl verschmutztem Wasser rasch zu vermehren. Es wird angenommen, dass die Akkumulation von Speicherlipiden eine mögliche Adaption zum Überstehen solch ungünstiger Bedingungen darstellt.^[10,13] Die TAG-Speicherung findet sich häufig bei der Gruppe der Actinomyceten, vor allem der Gattungen *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* und *Nocardia*. Gespeicherte TAGs wirken überwiegend als Speicherstoff, aber auch ein Einfluss auf die Regulation der Membranfluidität sowie ihre Funktion als Depot für Reduktionsäquivalente wird diskutiert.^[14] Ein zusätzlicher interessanter Aspekt des TAG-Stoffwechsels ist die Fähigkeit von *M. tuberculosis*, TAGs unter Nichtvirulenz- wie auch unter Virulenzbedingungen zu akkumulieren. Ein möglicher Einfluss des TAG-Metabolismus auf die Pathogenese dieses Bakteriums wird diskutiert.^[15,16]

In Eukaryoten sind verschiedene spezialisierte Enzymklassen für die Synthese von TAGs und Wachsestern verantwortlich.^[17] Erst vor kurzem wurde eine neue Klasse von Acyltransferasen in Bakterien identifiziert. Es wurde festgestellt, dass sie sowohl den letzten Schritt der TAG-Biosynthese als auch den der WE-Biosynthese katalysieren (Schema 1). Aufgrund ihrer physiologischen Reaktionen wurden sie Wachsester-Synthasen/Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (WS/DGATs; CoA = Coenzym A) genannt.^[18,19]

[*] Dipl.-Biol. T. Stöveken, Prof. Dr. A. Steinbüchel
Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Corrensstraße 3, 48149 Münster (Deutschland)
Fax: (+49) 251-833-8388
E-Mail: steinbu@uni-muenster.de
Homepage: <http://mibi1.uni-muenster.de/>



Schema 1. Typische In-vivo-Reaktionen, die von bakteriellen Acyltransferasen der WS/DGAT-Familie katalysiert werden. A) Wachsester-Synthase-Reaktion; B) Diacylglycerin-Acyltransferase-Reaktion.

Für die chemische Industrie sind Oleochemikalien von Interesse. Besonders die Wachsester haben viele mögliche Anwendungen, z. B. als Schmiermittel und Futtermittelzusatz sowie in der kosmetischen und medizinischen Industrie. Erste biotechnologische Prozesse auf WS/DGAT-Basis wurden bereits entwickelt und werden in den folgenden Abschnitten diskutiert. Heutzutage werden Wachsester hauptsächlich chemisch oder mithilfe immobilisierter Lipasen produziert.^[20] Lipasevermittelte Katalysen erfordern jedoch die chemische Produktion von Fettalkoholen als Substrat. Im Unterschied dazu ermöglicht die Verwendung der WS/DGATs die WE-Biosynthese ausgehend von günstigen erneuerbaren Ressourcen, z. B. Fettsäuren oder Kohlenhydraten.^[21–23]

2. WS/DGATs – eine neue Klasse von Acyltransferasen

In eukaryotischen Organismen sind zahlreiche Enzyme bekannt, welche die Übertragung von langketigen Acylresten katalysieren. Dies sind Mitglieder der DGAT1 und DGAT2-Familie sowie die Phospholipid:DAG-Acyltransferasen, welche die TAG-Synthese vermitteln, oder die Coenzym-A-abhängige Wachsester-Synthase aus Jojoba (*Simmondsia chinensis*).^[17, 24, 25] Eingehend charakterisiert wurden bisher nur die Wachsester-Synthase aus Jojoba und eine Diacylglycerin-Acyltransferase aus *Mortierella ramanniana* var. *angulispera*.^[25, 26]

Zwar wurden bereits zahlreiche Lipid speichernde Bakterien beschrieben, allerdings ist bislang nur wenig über die beteiligten Enzyme bekannt. Die erste bakterielle, langketige Acylreste übertragende Acyltransferase, die den letzten Schritt sowohl des TAG- als auch des WE-Stoffwechsels katalysiert, wurde 2003 in *A. baylyi* ADP1 (früher *A. calcoaceticus* ADP1) identifiziert. Dieses Enzym wird durch das Gen *atfA* kodiert.^[18] Das Protein wurde als difunktionelles Enzym beschrieben, das die Acyl-Coenzym-A-abhängige Acylierung von Diacylglyceriden wie auch Fettalkoholen katalysiert. Dieses neuartige Enzym wies keinerlei Homologien zu bekannten eukaryotischen DAG-Acyltransferasen oder der Jojoba-Wachsester-Synthase auf. Darüber hinaus konnten keine Homologien zu anderen bekannten Genen in den Datenbanken gefunden werden.^[18] Im Unterschied zu den eukaryotischen WS- und DGAT-Enzymen, bei denen es sich immer um Membranproteine handelt, ist die WS/DGAT eher amphiphil und nur lose über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert.^[19, 25–29]

Zur gleichen Zeit wurde eine weitere Familie von Acyltransferasen beschrieben, die langketige Acylreste übertragen. Diese so genannten Polyketid-assozierten Proteine (Pap) wurden zusätzlich zu den oben genannten WS/DGAT-Enzymen nahezu ausschließlich in Mycobakterien gefunden; nur ein homologes Gen wurde in *Streptomyces coelicolor* identifiziert.^[30] Obwohl diese beiden Enzymfamilien einige in Abschnitt 4 diskutierte Ähnlichkeiten aufweisen, gleichen ihre Sequenzen einander nicht. Das Auftreten zweier unabhängiger Acyltransferasen in Mycobakterien unterstreicht die Wichtigkeit von Lipid synthetisierenden oder modifizierenden Enzymen für diese pathogenen Bakterien.



Tim Stöveken, geboren 1975, studierte an der Universität Münster Biologie und beendete seine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Steinbüchel im Herbst 2003. Im Rahmen seiner Doktorarbeit befasste er sich unter Anleitung von Prof. Steinbüchel mit der biochemischen Charakterisierung und der biotechnologischen Anwendbarkeit bakterieller Acyltransferasen.



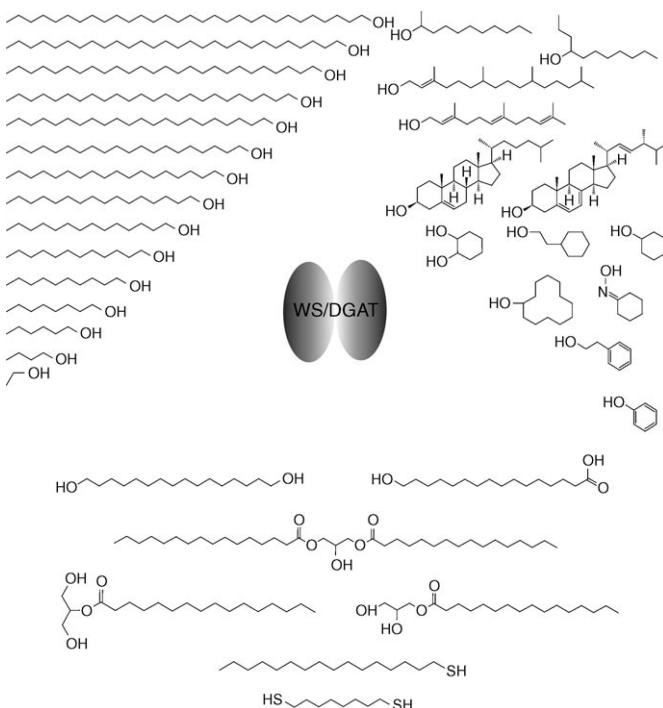
Alexander Steinbüchel, geboren 1953, studierte Biologie an der Universität Göttingen. Nach seiner Promotion bei Prof. Schlegel forschte er ein Jahr an der Rockefeller Universität (New York) bei Prof. DeDuve. Zurück in Göttingen habilitierte er 1991. Seit 1994 ist er Professor für Mikrobiologie und Direktor des Instituts für Mikrobiologie an der Universität Münster. 1992 erhielt der den Forschungspreis der Philip Morris Stiftung. Er befasst sich unter anderem mit dem Metabolismus und der biotechnologischen Produktion von Polyhydroxyalkanoaten sowie der Biosynthese und biotechnologischen Produktion von Polyamiden.

3. Katalytisches Potenzial bakterieller Acyltransferasen

Die Acyltransferasen haben auch wegen ihres außerordentlich breiten Substratspektrums Interesse geweckt.^[19] Die WS/DGAT aus *A. baylyi* ADP1 beispielsweise stellte sich als nahezu generelle Acyltransferase heraus. Die WS/DGAT akzeptiert lineare Alkohole von Ethanol bis zu Triacontanol. Die höchsten Aktivitäten wurden für Alkohole mittlerer Kettenlänge zwischen Tetradecanol und Octadecanol gemessen. Die Aktivität gegenüber Ethanol oder Butanol war gering, aber auch diese wurden als Substrate akzeptiert. Bei langketigen Alkoholen mit mehr Kohlenstoffatomen als Dodecanol nahm die Aktivität mit steigender Kettenlänge ab, allerdings wurde selbst Triacontanol noch als Substrat akzeptiert. Die Spezifität gegenüber der zweiten Komponente der WS-Reaktion, den Acyl-CoA-Thioestern, wurde nur für Thioester mit Acylresten mit C₂–C₂₀-Ketten analysiert. Alle diese untersuchten Acyl-CoA-Substrate konnten effizient als Acyldonoren verwendet werden. Die höchsten Aktivitäten wurden aber mit Kohlenstoffkettenlängen im Bereich C₁₄–C₁₈ erhalten. Der Vergleich der primären und sekundären Alkohole 1-, 2- und 3-Decanol zeigte eine klare Präferenz für den primären Alkohol, wobei jedoch auch die beiden sekundären Alkohole als Substrate akzeptiert wurden.

Mit der WS/DGAT ließen sich jedoch nicht nur Wachsmonoester synthetisieren: Die Bildung von Wachsdiestern wurde anhand der WS/DGAT-vermittelten zweifachen Acylierung von Hexadecandiol demonstriert. Außer den natürlichen Substraten, den linearen Alkoholen, acylierte das Enzym auch cyclische, aliphatische und aromatische Alkohole. Selbst die enzymkatalysierte Acylierung von Cyclohexanoxim wurde demonstriert. Die Acylierung von Steroiden wurde sowohl für Cholesterin als auch für Ergosterin anhand von Lysaten WS/DGAT exprimierender *E. coli*-Zellen nachgewiesen. Interessanterweise führte die Expression des *atfA*-Gens in einer Vierfachmutante von *Saccharomyces cerevisiae*, die nicht mehr in der Lage war, TAG oder Sterolester zu synthetisieren, zur Wiederherstellung der TAG-Synthese, nicht aber der Sterolestersynthese.^[31] Darüber hinaus katalysiert das Enzym nicht nur die Bildung von Oxoestern ausgehend von langketigen Fettalkoholen und langketigen Fettsäuren, sondern auch die Bildung der entsprechenden Thiwachsester.^[22] Die andere in vivo katalysierte Reaktion der WS/DGAT ist die Acylierung von Diacylglyceriden. Für diese Substrate zeigte sich eine klare Bevorzugung der terminalen Hydroxygruppen, wobei besonders hohe Acylierungsraten für die sn-3-Position beobachtet wurden. Interessanterweise dienten auch Monoacylglycerine als Substrate. Dies könnte darauf hinweisen, dass die DAG-Synthese nicht ausschließlich über den „Kennedy“-Syntheseweg in Form einer sequenziellen Acylierung von Glycerol-3-phosphat verläuft, sondern möglicherweise auch unter Beteiligung der WS/DGAT. Über die bereits dargestellten Substrate hinaus wurden zahlreiche Mono-, Di- und Oligosaccharide, wie Glucose, Fructose, Galactose, Cellulose und Agarose, als mögliche Acylakzeptoren untersucht. Unter den Reaktionsbedingungen, die für die bisher beschriebenen Substrate genutzt worden waren, konnte für diese Moleküle jedoch keine

Acylierung nachgewiesen werden; weitere Beispiele für nicht acyierte Moleküle sind L-Tyrosin, D,L-Lactonsäure, Ferula-säure und 1-Naphtol.^[49] Das außerordentlich breite Substratspektrum führt zu der Annahme, dass nur die Bereitstellung von hydrophoben Substraten durch die Wirtszelle die Bildung von möglichen Produkten limitiert (Schema 2).



Schema 2. Überblick über Hydroxygruppen enthaltene Substrate von bakteriellen Acyltransferasen der WS/DGAT-Familie.

Nach der Beschreibung der WS/DGAT aus *A. baylyi* ADP1 wurden weitere Acyltransferasen dieses Typs identifiziert. Die meisten der 15 WS/DGAT-homologen Proteine aus *M. tuberculosis* H37Rv zeigten sowohl DGAT- als auch WS-Aktivität. Wie angenommen, wiesen alle Enzyme deutlich höhere DGAT- als WS-Aktivität auf. Dies ist in Einklang mit dem Auftreten von TAGs in diesen Bakterien, wogegen keine WEs als Speicherstoff für Mycobakterien beobachtet wurden.^[16]

Im Genom von *A. borkumensis* SK2 wurden zwei homologe Acyltransferasegene identifiziert (*atfA1* und *atfA2*). Wie die WS/DGAT aus *A. baylyi* ADP1 hatten auch die von diesen Genen kodierten Enzyme ein sehr breites Substratspektrum. AtfA1 akzeptierte zahlreiche lineare Alkohole unterschiedlicher Kettenlänge. Die höchste Aktivität wurde für Decanol gefunden. Butanol wurde ebenfalls effizient acyliert, während nur eine geringe Aktivität gegenüber Tetracosanol festgestellt wurde. Interessanterweise war dieses Enzym auch gegenüber cyclischen und aromatischen Alkoholen, darunter Cyclohexanol und Cyclohexylethanol, sehr aktiv. Lineare Alkohole wurden von AtfA2 ähnlich gut umgesetzt wie von AtfA1. Die höchste Aktivität wurde für AtfA2 gegenüber Decanol und Butanol gefunden; Tetracosanol wurde hingegen nur in geringem Maße akzeptiert. Die Spezifität von

AtfA2 gegenüber cyclischen und aromatischen Alkoholen war noch höher als jene von AtfA1. Es wurden allerdings drastische Aktivitätsunterschiede gegenüber verschiedenen Palmitoylglycerin-Substraten festgestellt. Auffälligerweise wurde DGAT-Aktivität nur für AtfA1 nachgewiesen, wohingegen für AtfA2 keinerlei signifikante Aktivität mit Di-palmitoylglycerin (DPG) nachgewiesen werden konnte. AtfA2 war aber dennoch in der Lage, 1-, 2- und 3-Mono-palmitoylglycerin sehr effizient zu acylieren. AtfA1 wies hingegen eine klare Präferenz für 1-Monopalmitoylglycerin auf. Die Akkumulation von WEs und TAGs in *A. borkumensis* SK2 kann aber hauptsächlich auf AtfA1-Aktivität zurückgeführt werden, da die Inaktivierung von *atfA2* weder die Menge noch die Zusammensetzung der Speicherlipide ändert.^[10]

In *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM8798 wurden die vier homologen Gene *ws1*, *ws2*, *ws3* und *ws4* identifiziert. Nur für WS1 und WS2 wurde das Substratspektrum beschrieben. Eine TAG-Bildung wurde nur für WS1 gefunden. Wie bei den übrigen untersuchten Acyltransferasen ist die Spezifität von WS2 gegenüber linearen, primären Alkoholen gering, wobei kürzerkettige Alkohole wie Decanol und Dodecanol bevorzugt wurden. Die höchsten Aktivitäten wurden mit der Acyl-CoA-Komponente Palmitoyl-CoA erzielt, wobei längere oder kürzere Ketten in geringerem Maße akzeptiert wurden. Die Aktivität und die Substratspezifität von WS1 aus *M. hydrocarbonoclasticus* waren ähnlich zu jenen des *A.-baylyi*-Enzyms, zu dem eine Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene von 45 % besteht. Eine Eigenheit von *M. hydrocarbonoclasticus* ist die Speicherung von Isoprenoid-Wachsestern beim Wachstum auf Phytol, wobei sowohl WS1 als auch WS2 zur Bildung von Isoprenoid-WEs in der Lage sind.^[11,32]

Alle bislang charakterisierten Enzyme sind effiziente Acyltransferasen mit breitem, wenngleich deutlich unterschiedlichem Substratspektrum. Aus diesem Grund wird die weitere Untersuchung bakterieller Acyltransferasen höchstwahrscheinlich zur Entdeckung von Enzymen mit weiteren biotechnologisch interessanten Substratspezifitäten führen. Beispiele für mögliche Produkte sind Mono- und Diacylglyceride, die als wertvolle Emulgatoren eingesetzt werden. Ein weiteres Beispiel wäre die Synthese von Zuckerstern, die biologisch verträgliche Tenside darstellen. Darüber hinaus könnte die Veresterung von bioaktiven Molekülen wie Vitaminen, Steroiden oder Sekundärmetaboliten von Pflanzen mithilfe von Acyltransferasen durchgeführt werden, sofern diese Verbindungen Hydroxy- oder Thiolgruppen tragen. Ein solcher Ansatz könnte zur Produktion von Molekülen genutzt werden, die zwar ihre Bioaktivität beibehalten, aber eine veränderte Löslichkeit, Diffusion oder Stabilität aufweisen. Betrachtet man die verschiedenen Habitate und Kohlenstoffquellen der zuvor genannten Bakterien, kann angenommen werden, dass die festgestellten Unterschiede in ihrer Substratspezifität aus einer Anpassung an die zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen resultieren, zumal diese maßgeblich die Zusammensetzung der gespeicherten WEs bestimmen.^[19,10,11]

4. Das vorgeschlagene Motiv des aktiven Zentrums

Durch multiple Sequenzvergleiche konnte die hoch konservierte Domäne HHXXXDG in WS/DGATs als Teil des katalytischen Zentrums identifiziert werden. Nahezu alle WS/DGAT-Homologen haben exakt dieses Motiv. In den meisten der bisher als aktiv beschriebenen Acyltransferasen war dieses Motiv nicht oder nur marginal verändert.^[10,11,16,18,19] Das HHXXXDG-Motiv (NCBI Conserved Domain Data Base accession pfam00668) ist das aktive Zentrum von nichtribosomalen Peptidsynthetasen.^[33]

Eine weitere Gruppe von Enzymen, die dieses Motiv als aktives Zentrum enthalten, sind die Polyketid-assoziierten Proteine (Pap). Die katalysierten Reaktionen dieser Enzyme ähneln denen der WS/DGATs stark. Das Substratspektrum von PapA5 aus *M. tuberculosis* umfasst Alkohole unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge, darunter auch sekundäre und tertiäre Alkohole.^[30] Zwei weitere Pap-Enzyme, PapA2 und PapA1 aus *M. tuberculosis*, katalysieren die sukzessive Veresterung von Trehalose-2-sulfat.^[34] Obwohl Strukturinformationen für einen Teil dieser Enzyme vorliegen, konnte wegen der geringen Sequenzähnlichkeiten kein Vergleich der strukturellen Homologie aufgestellt werden.^[35,36] Ein weiteres verwandtes, gut charakterisiertes Enzym ist die Chloramphenicol-Acetyltransferase. Wie im Fall der Pap-Enzyme waren hier wegen geringer Sequenzähnlichkeiten keine Strukturvergleiche möglich. Obwohl die Sequenzen sehr verschieden sind, kann aber angenommen werden, dass der Katalysemechanismus dieser Enzymklassen eng verwandt ist.

Der Austausch von His132 oder His133 gegen Leucin der *A.-baylyi*-ADP1-Acyltransferase durch ortsspezifische Mutationen reduzierte die Aktivität drastisch, wogegen Mutationen von Asp137 und Gly138 keine signifikanten Auswirkungen auf die Aktivität hatten. Der vollständige Aktivitätsverlust bei einer Mutante, in der beide Histidinreste gegen Leucin ausgetauscht waren, ließ darauf schließen, dass der Verlust eines Histidins zu einem geringen Teil durch den verbliebenen Histidinrest aufgefangen werden konnte.^[49] Die Histidinreste agieren als Base und deprotonieren die Hydroxygruppe des Fettalkohols oder des DAG. Das entstandene Oxoanion wirkt dann als Nucleophil für das Kohlenstoffatom der Thioesterbindung von Acyl-CoA. Dies resultiert in der Bildung der Oxoesterbindung des WE bzw. TAG. Anschließend wird der protonierte Histidinrest durch Transfer des Protons auf CoA-S⁻ regeneriert.

5. In-vivo-Produktion von Fettsäurederivaten in rekombinannten Bakterien

In industriellen Prozessen gehören Lipasen und Stärke hydrolysierende Enzyme zu den meistverwendeten Enzymen. Sie werden als Biokatalysatoren für die Hydrolyse, Veresterung, Umesterung und Alkoholyse verwendet.^[37,38] Die meisten lipasekatalysierten Prozesse werden in Abwesenheit von Wasser in organischen Lösungsmitteln durchgeführt; dagegen katalysieren die bakteriellen Acyltransferasen diese biotechnologisch relevanten Reaktionen in wässrigen Systemen.

men. Diese Enzyme sind jedoch abhängig von CoA-aktivierte Fettsäuren; aus diesem Grund werden hier In-vitro-Techniken, wie sie für Lipasen verwendet werden, niemals wirtschaftlich werden können. Dennoch bietet die Abhängigkeit von CoA-Estern einen möglichen Vorteil: Anders als bei Lipasen ist die Acylierung bei WS/DGATs die native, unter physiologischen Bedingungen ablaufende Reaktion und kann daher in vivo durchgeführt werden. Die einzige Voraussetzung ist die Bereitstellung von Substraten durch den jeweiligen Wirt.

Die erste In-vivo-Produktion von WE-Derivaten wurde für eine *A.-baylyi*-ADP1-Mutante beschrieben, der eine Acyl-CoA-Reduktase (Acr1) fehlt, die den ersten Schritt der WE-Biosynthese katalysiert.^[18,39,40] Dieser Stamm war somit nicht in der Lage, langkettige Aldehyde zu produzieren, die normalerweise weiter zu langkettigen Alkoholen reduziert würden; daher kann der gewünschte Alkoholbestandteil extern, zusammen mit dem Medium, bereitgestellt werden. Dieser wird dann mit den endogenen Acyl-CoAs zum entsprechenden WE verestert. Dies wurde zuerst für die In-vivo-Veresterung von 1,16-Hexadecandiol mit Palmitin- und Ölsäure, aber auch für die Synthese von Thio- und Dithiowachsestern wie Palmitinsäurehexadecylthioester oder 1,8-S-Dipalmitoyloctadecandithiol demonstriert.^[22,41] Thioester sind interessant, da sie als aktivierte Ester für die Synthese von Peptiden oder Makrolid-Antibiotika verwendet werden können.^[42–44] Es ist zwar erforderlich, diese Prozesse für mögliche industrielle Anwendungen weiter zu optimieren, die generelle Durchführbarkeit wurde aber immerhin demonstriert. Wegen der geringen Substratspezifität der WS/DGATs ist es darüber hinaus wahrscheinlich, dass dieser Biokatalysator für die Synthese einer Vielzahl von maßgeschneiderten WEs genutzt werden kann.

Ein weiterer Ansatz für die In-vivo-Synthese wurde für rekombinantes *E. coli* beschrieben. Natürlichweise ist dieses Bakterium nicht in der Lage, WEs zu synthetisieren. Die heterologe Expression der WS/DGATs allein führte nicht zur Akkumulation von WEs. Das Problem ist das Fehlen einer Aldehyd-Reduktase, die den zweiten Schritt der WE-Biosynthese katalysiert. Da keine bakterielle Fettaldehyd-Reduktase beschrieben ist, haben Kalscheuer et al. eine Acyl-CoA-Reduktase aus *Simmondsia chinensis* verwendet, die auch über eine Fettaldehyd-Reduktase-Aktivität verfügt,^[45] was schließlich in der Bildung von WEs resultierte (Schema 3).^[21] Außer der Speicherung von langkettigen WEs, wie Palmitoyloleat, Oleyoleat oder Palmitoylpalmitat, wurde auch die Bildung von Fettsäurebutylestern beobachtet. Die Butylesterbildung wurde auf Spuren von 1-Butanol in einer Medienkomponente zurückgeführt. Dies unterstreicht nochmals die außergewöhnlich geringe Spezifität dieses Enzyms.

Fettsäuremethyl- (FAMEs) und Fettsäureethylester (FAEEs) sind ein möglicher Ersatz für Diesel auf Erdölbasis. Der Bedarf für alternative Energiequellen nimmt seit einigen Jahren stark zu. FAMEs werden normalerweise aus Pflanzenöl, durch alkalische Umesterung von TAGs, gewonnen; sie werden auch als Biodiesel bezeichnet. Der Hauptvorteil von Biodiesel ist, dass er überwiegend aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen wird und seine CO₂-Bilanz ausgeglichen ist; lediglich das für die Umesterung verwendete Me-

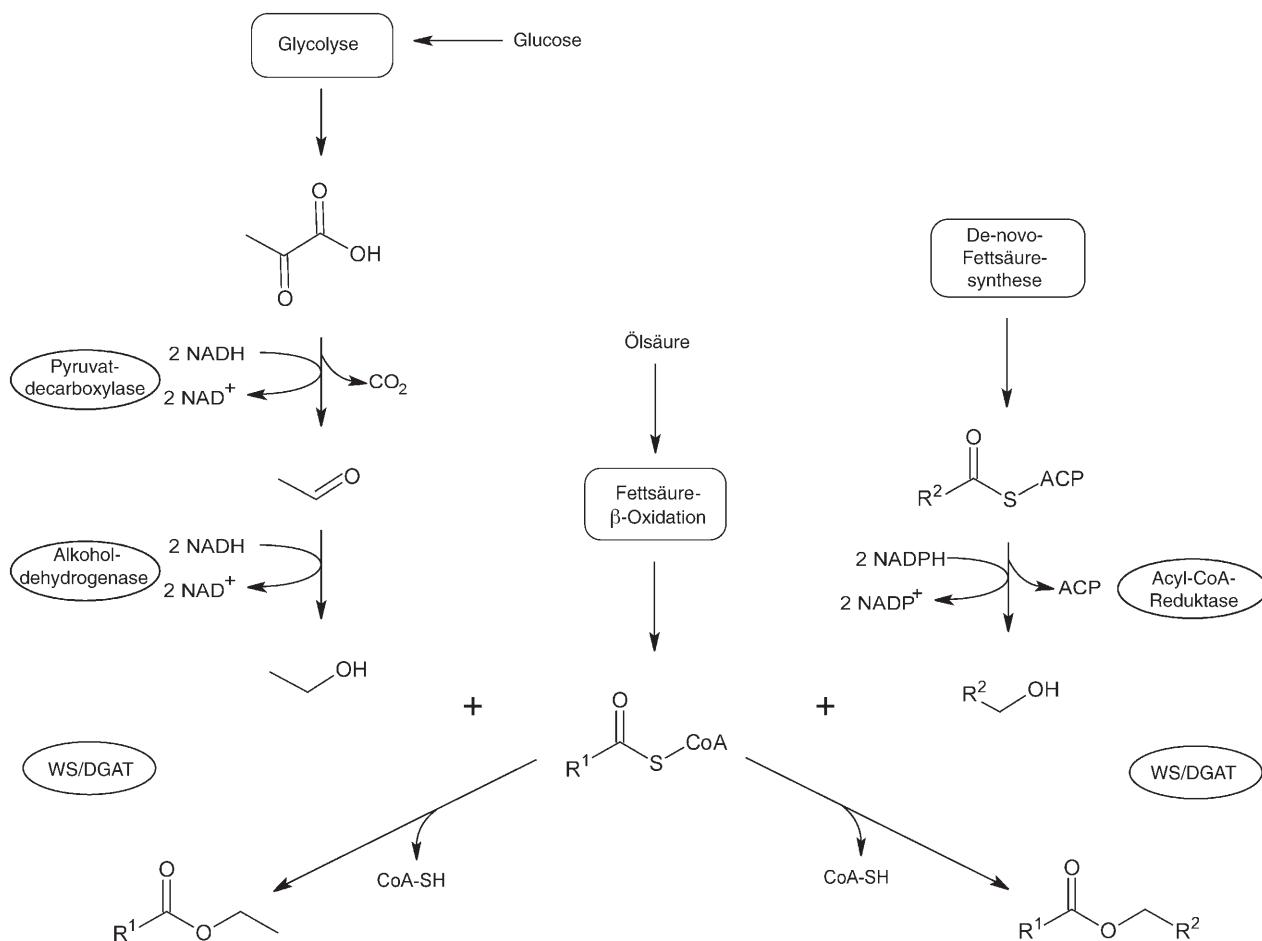
thanol wird überwiegend aus Synthese- und Erdgas gewonnen. Darüber hinaus können Biodiesel und konventioneller Diesel in den gleichen Maschinen verwendet werden. Ein Nachteil ist die begrenzte verfügbare landwirtschaftliche Nutzfläche, die bereits heute nahezu vollständig genutzt wird.

Wie eingangs beschrieben, ist die WS/DGAT in der Lage, Ethanol als Substrat zu verwenden und so FAEE zu bilden. 2006 haben wir den WS/DGAT nutzenden „Mikrodiesel“-Prozess veröffentlicht.^[23] Für diesen Prozess wurde ein rekombinanter Stamm von *E. coli* erzeugt, der die Gene *pdc* (für Pyruvat-Decarboxylase) und *adhB* (für Alkohol-Dehydrogenase) für die Ethanolsynthese aus *Zymomonas mobilis* und das Gen *atfA* aus *A. baylyi* ADP1 zusammen auf einem Plasmid (pMicrodiesel) enthielt. Die FAEE-Biosynthese ist in Schema 3 zusammengefasst. In dieser erstmaligen Beschreibung eines biotechnologischen Prozesses zur FAEE-Produktion konnte die intrazelluläre Speicherung von Mikrodiesel erreicht werden (Schema 3). Eines der Hauptprobleme in diesem Prozess ist die relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeit von WS/DGAT mit Ethanol als Substrat.^[19] Bedenkt man aber die relativ große Zahl kürzlich gefundener Acyltransferasen, so ist es wahrscheinlich, dass sich darunter Enzyme finden lassen, die besser für diese Reaktionen geeignet sind. Zudem könnten durch gerichtete Evolution Acyltransferasen selektiert werden, die eine höhere Spezifität gegenüber Ethanol aufweisen.^[39] Für die Mikrodieselproduktion spricht auch die Aussicht, einen Prozess entwickeln zu können, der Massengüter wie Zucker oder – noch besser – Stärke, Cellulose und Hemicellulose nutzt. Dies würde nicht nur die Ressourcen zur Kraftstoffproduktion erweitern, sondern darüber hinaus auch nicht im Konflikt mit der Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion stehen. Mikrodiesel wird andere Biokraftstoffe sicher nicht in näherer Zukunft ersetzen, hat aber das Potenzial, Teil eines nachhaltigen Energiesmix zu werden, der ohne fossile Ressourcen auskommt.

6. Zukünftige Anwendungen

Seit der ersten Beschreibung bakterieller Acyltransferasen wurde intensiv daran geforscht, mithilfe dieses Enzyms Prozesse zur In-vivo-Produktion von WEs und anderen Oleochemikalien, ausgehend von erneuerbaren Ressourcen, zu entwickeln. Die grundsätzliche Anwendbarkeit wurde für zahlreiche Produkte aufgezeigt.^[21–23,41] Wegen des ausgesprochen breiten Substratspektrums dieses Enzyms ist es wahrscheinlich, dass eine biotechnologische Produktion weiterer Ester gelingen wird. Für alle zukünftigen Anwendungen ist es notwendig, Enzyme zu identifizieren, die im Hinblick auf die Substratspezifität und die physikalischen Bedingungen perfekt an den jeweiligen Prozess adaptiert sind. Nach geeigneten Enzymen kann unter den zahlreichen Acyltransferasen gesucht werden, die in den Datenbanken zu finden sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Methoden zur gerichteten Proteinevolution.^[46–48] Zu diesem Zweck müssen effiziente Screening-Systeme, die z. B. auf Nilrotfärbung beruhen, angewendet werden.^[39]

Wie in Abschnitt 5 beschrieben, ist *E. coli* nicht der ideale Stamm zur FAEE- und WE-Produktion. Die Bereitstellung



Schema 3. Rekombinante Wachsester- und Fettsäureethylester-Biosynthese in *E. coli*. Modulares System zur Biosynthese von maßgeschneiderten Wachsestern. Die Wahl der Alkohol synthetisierenden Reaktion führt zur Biosynthese des gewünschten Esters *in vivo* ausgehend von erneuerbaren Ressourcen. ACP = Acyl-Carrier-Protein, NADPH = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat.

von CoA-aktivierten Fettsäuren scheint ein weiterer Ansatzzpunkt zur Optimierung zu sein. Die Verwendung alternativer Produktionsstämme könnte dieses Problem lösen. TAG und WE speichernde Stämme wie *R. opacus* oder *A. baylyi* ADP1 haben einen hohen Gehalt an Acyl-CoA. In diesem Hinblick könnte besonders *R. opacus* interessant sein, da er in der Lage ist, TAGs bis zu einem Gehalt von 90% seiner Zelltrockenmasse zu speichern und zudem zu hohen Zelldichten kultiviert werden kann.^[14]

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (STE 386/7-3) unterstützt. Wir danken allen früheren und jetzigen Mitgliedern unseres Arbeitskreises, die an den Untersuchungen zum bakteriellen Lipidmetabolismus beteiligt waren, für ihre fachkundige Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen.

Eingegangen am 15. November 2007
Online veröffentlicht am 9. April 2008

- [1] A. Steinbüchel in *Biotechnology*, Vol. 6 (Hrsg.: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler), 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **1996**, S. 403–464.
- [2] A. Steinbüchel, S. Hein, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2001**, 71, 81–123.
- [3] M. Obst, A. Steinbüchel in *Microbiology Monographs*, Vol. 1 (Hrsg.: J. M. Shively), Springer, Berlin, **2006**, S. 167–193.
- [4] R. S. Kennedy, W. R. Finnerty, *Arch. Microbiol.* **1975**, 102, 85–90.
- [5] M. E. Singer, S. M. Tyler, W. R. Finnerty, *J. Bacteriol.* **1985**, 162, 162–169.
- [6] L. M. Fixter, J. G. McCormack, *Biochem. Soc. Trans.* **1976**, 4, 504–505.
- [7] H. M. Alvarez, R. Kalscheuer, A. Steinbüchel, *Fett/Lipid* **1997**, 99, 239–246.
- [8] K. E. Bryn, E. Jantzen, K. Bovre, *J. Gen. Microbiol.* **1977**, 102, 33–43.
- [9] N. J. Russell, J. K. Volkman, *J. Gen. Microbiol.* **1980**, 118, 131–141.
- [10] R. Kalscheuer, T. Stöveken, U. Malkus, R. Reichelt, P. N. Go-lyshin, J. S. Sabirova, M. Ferrer, K. N. Timmis, A. Steinbüchel, *J. Bacteriol.* **2006**, 189, 918–928.
- [11] E. Holtzapfel, C. Schmidt-Dannert, *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 3804–3812.

- [12] M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, S. Lang, E. R. Moore, W. R. Abraham, H. Lunsdorf, K. N. Timmis, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1998**, *48*, 339–348.
- [13] S. Schneiker, V. A. P. Martins dos Santos, D. Bartels, T. Bekel, M. Brecht, J. Buhrmester, T. N. Chernikova, R. Denaro, M. Ferrer, C. Gertler, A. Goesmann, O. V. Golyshina, F. Kaminski, A. N. Khachane, S. Lang, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, T. Nechitaylo, A. Pühler, D. Regenhardt, O. Rupp, J. S. Sabirova, W. Selbitschka, M. M. Yakimov, K. N. Timmis, F. J. Vorholter, S. Weidner, O. Kaiser, P. N. Golyshin, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 997–1004.
- [14] H. M. Alvarez, A. Steinbüchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 367–376.
- [15] N. J. Garton, H. Christensen, D. E. Minnikin, R. A. Adegbola, M. R. Barer, *Microbiology* **2002**, *148*, 2951–2958.
- [16] J. Daniel, C. Deb, V. S. Dubey, T. D. Sirakova, B. Abomoelak, H. R. Morbidoni, P. E. Kolattukudy, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5017–5030.
- [17] K. Athenstaedt, G. Daum, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1355–1369.
- [18] R. Kalscheuer, A. Steinbüchel, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8075–8082.
- [19] T. Stöveken, R. Kalscheuer, U. Malkus, R. Reichelt, A. Steinbüchel, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 1369–1376.
- [20] G. Hills, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 601–607.
- [21] R. Kalscheuer, T. Stöveken, H. Luftmann, M. Malkus, R. Reichelt, A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1373–1379.
- [22] S. Uthoff, T. Stöveken, N. Weber, K. Vosmann, E. Klein, R. Kalscheuer, A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 790–796.
- [23] R. Kalscheuer, T. Stölting, A. Steinbüchel, *Microbiology* **2006**, *152*, 2529–2536.
- [24] R. Lehner, A. Kuksis, *Prog. Lipid Res.* **1996**, *35*, 169–201.
- [25] K. D. Lardizabal, J. G. Metz, T. Sakamoto, W. C. Hutton, M. R. Pollard, M. W. Lassner, *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 645–655.
- [26] Y. Kamisaka, S. Mishra, T. Nakahara, *J. Biochem.* **1997**, *121*, 1107–1114.
- [27] J. Cao, P. Burn, Y. Shi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25657–25663.
- [28] S. Cases, S. J. Smith, Y. W. Zheng, H. M. Myers, S. R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C. B. Welch, A. J. Lusis, S. K. Ericson, R. V. Farese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13018–13023.
- [29] M. Wältermann, A. Steinbüchel, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3607–3619.
- [30] K. C. Onwueme, J. A. Ferreras, J. Buglino, C. D. Lima, L. E. N. Quarai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4608–4613.
- [31] R. Kalscheuer, H. Luftmann, A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 7119–7125.
- [32] J. F. Rontani, P. C. Bonin, J. K. Volkmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5484–5492.
- [33] V. Bergendahl, U. Linne, A. Marahiel, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 620–629.
- [34] P. Kumar, M. W. Schelle, M. Jain, F. L. Lin, C. J. Petzhold, M. D. Leavell, J. A. Leary, J. S. Cox, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11221–11226.
- [35] J. Buglino, K. C. Onwueme, J. A. Ferreras, L. E. Quadri, C. D. Lima, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30634–30642.
- [36] T. A. Keating, C. G. Marshall, C. T. Walsh, A. E. Keating, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 522–526.
- [37] R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694–1720; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633.
- [38] M. J. E. C. van der Maarel, B. van der Veen, C. M. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, *J. Biotechnol.* **2002**, *94*, 137–155.
- [39] M. Wältermann, T. Stöveken, A. Steinbüchel, *Biochimie* **2007**, *89*, 230–242.
- [40] S. Reiser, C. Somerville, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2969–2975.
- [41] R. Kalscheuer, S. Uthoff, H. Luftmann, A. Steinbüchel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 578–584.
- [42] T. Nakajima, Y. Yabushita, I. Tabushi, *Nature* **1975**, *256*, 60–61.
- [43] D. C. Taylor, N. Weber in *CRC handbook of chromatography: analysis of lipids* (Hrsg.: K. D. Mukherjee, N. Weber), CRC, Boca Raton, FL, **1993**, S. 285–320.
- [44] S. Masamune, S. Kamata, W. Schilling, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3515–3516.
- [45] J. G. Metz, M. R. Pollard, L. Anderson, T. R. Hayes, M. Lassner, *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 635–644.
- [46] U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 554–559.
- [47] U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543–547.
- [48] U. T. Bornscheuer, C. Bessler, R. Srinivas, S. H. Krishna, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 433–437.
- [49] T. Stöveken, unveröffentlichte Ergebnisse.