

Entdeckung einer neuen Enzymklasse: Eine Nicht-Häm-Oxidase produziert mittellange 1-Alkene**

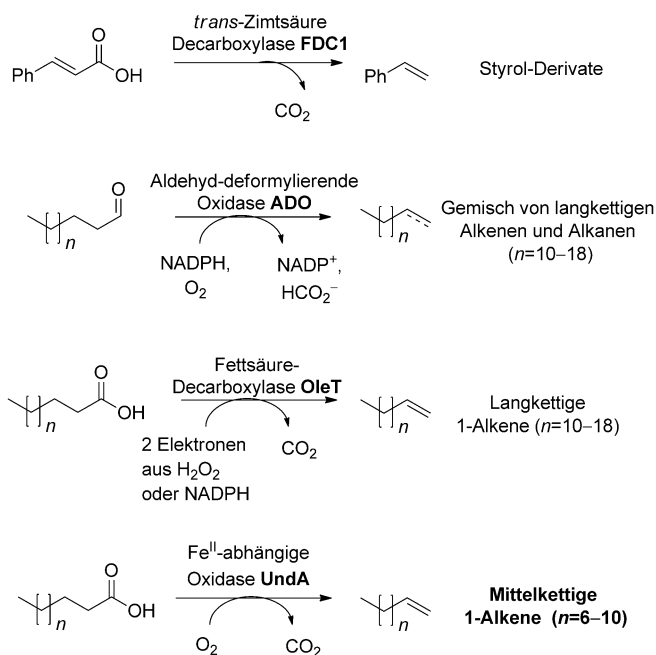
Robert Kourist*

1-Alkene · Biotransformationen · Erneuerbare Rohstoffe · Kohlenwasserstoffe · Oxidative Decarboxylierung

Terminale Alkene sind wichtige Plattformchemikalien, die in Raffinerien im 100 000-Tonnen-Maßstab hergestellt werden. Ihre Attraktivität als Basischemikalien beruht auf der vielseitigen Alkenfunktion, die eine Vielzahl an Derivatisierungen ermöglicht. Mittlere und langkettige Olefine werden insbesondere zur Herstellung von Waschmitteln, Schmierstoffen und Additiven eingesetzt. Das vorhersehbare Versiegen fossiler Ressourcen schafft daher einen dringenden Bedarf an alternativen Syntheserouten. Während nachwachsende Rohstoffe bereits einen potentiellen Ersatz für viele Erdöl-basierte Chemikalien wie ω -Aminocarbonsäuren und Dicarbonsäuren bieten,^[1] sind natürlich vorkommende 1-Alkene nur in sehr geringen Mengen verfügbar.

Trotz der großen präparativen Bedeutung der terminalen Alkenfunktion spielt sie im natürlichen Stoffwechsel nur eine marginale Rolle.^[2] Der Metabolismus setzt Kohlendioxid und Wasser zu Kohlenhydraten um, die über mehrere Schlüsselintermediate wie Phosphoenolpyruvat, Pyruvat, Acetyl-CoA und α -Ketoglutarat weiter zu Aminosäuren, Kohlenhydraten und Lipiden umgesetzt werden. Nur einige spezialisierte und oftmals nicht-essentielle Reaktionswege führen zu Sekundärmetaboliten wie Terpenen und Alkaloiden. Terminale Alkene spielen in diesen Routen keine essentielle Rolle. Die geringe Zahl an natürlichen Reaktionen zur Synthese von Olefinen spiegelt sich auch in der biotechnologischen Anwendung wider: Während mittels fermentativer Prozesse Aminosäuren, organische Säuren, Alkohole und Lipide im Millionen-Tonnen-Maßstab hergestellt werden, gibt es kein kommerzielles biotechnologisches Verfahren zur Herstellung mittel- und langkettiger 1-Alkene.

Interessanterweise konnten in den letzten Jahren mehrere neue Reaktionen zur Synthese terminaler Alkene aufgeklärt werden (Schema 1). Phenolsäure-Decarboxylasen z.B. katalysieren die Synthese von Styrol-Derivaten.^[3] Die Fettsäure-Decarboxylase OleT aus dem Gram-positiven Bakterium *Jeotgalicoccus* katalysiert die direkte Umwandlung von Fett-



Schema 1. Biokatalytische Synthese von 1-Alkenen. Die kürzlich entdeckte Oxidase UndA ist ein vielversprechender Katalysator für die Herstellung mittellanger 1-Alkene.

säuren in langkettige 1-Alkene. OleT wurde erfolgreich in Biotransformationen und zur fermentativen Olefinsynthese eingesetzt.^[4] Die Fettaldehyd-Deformylase ADO aus *Nostoc punctiforme* stellt terminale Olefine her und ermöglichte die Synthese langkettiger Alkene in einem genetisch modifizierten *E. coli*-Stamm.^[5] Da OleT und ADO eine hohe Spezifität für langkettige Substrate zeigen, sind natürliche Katalysatoren zur Herstellung mittellanger Alkene rar.

In einer herausragenden aktuellen Publikation berichtete nun die Arbeitsgruppe um Wenjun Zhang von der University of California über eine neue Oxidase, die mittellange Fettsäuren zu den entsprechenden Olefinen umsetzt.^[6] Die Gruppe entdeckte das Enzym bei der Untersuchung des bis dahin noch unbekannten Mechanismus der Bildung von 1-Undecen in *Pseudomonas aeruginosa*.

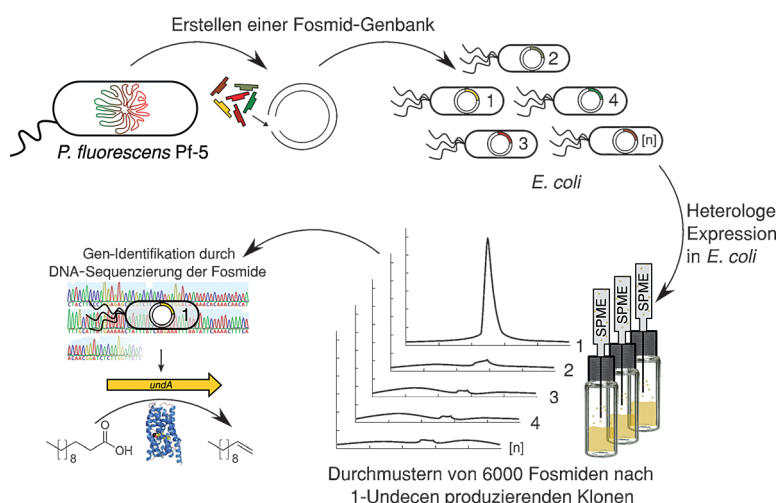
Zhang et al. folgten dabei sowohl einem bioinformatischen als auch einem experimentellen Ansatz. Da die Suche in Genomen von Pseudomonaden keine Homologen bekannter Enzyme der Alkensynthese ergab, verfolgten sie eine

[*] Jun.-Prof. Dr. R. Kourist
Junior Research Group for Microbial Biotechnology
Ruhr-University Bochum
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
E-Mail: Robert.Kourist@rub.de

[**] Der Autor dankt Uwe Bornscheuer und Johannes Kabisch von der Universität Greifswald für spannende Diskussionen zur mikrobiellen Olefinsynthese.

komparative Genomanalyse. Diese ergab jedoch mehrere tausend potenzielle Kandidaten – was die Limitation dieses rein Daten-basierten Ansatzes zeigt.

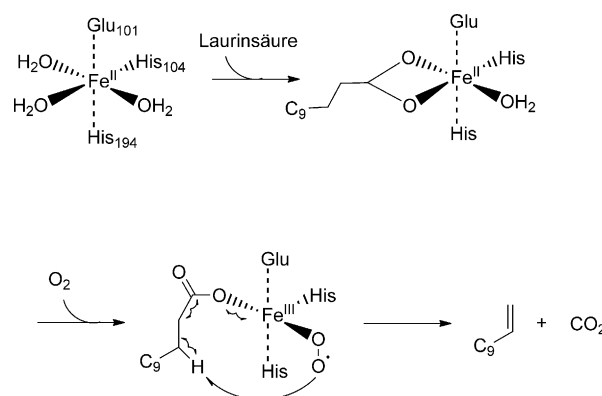
Schlüssel zur Entdeckung des Enzyms war eine hochsensitive Analytik über Festphasenextraktion und GC/MS, welche die Bestimmung sehr kleiner Mengen (≈ 1 ng) des leichtflüchtigen 1-Undecens erlaubte. Zhang et al. screenen 6000 Klone einer Genombibliothek von *P. fluorescens* Pf-5 und identifizierten so ein Gen, dass in *E. coli* zur Bildung von ca. $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1-Undecen führte (Schema 2). Sequenzierung dieses Klonen zeigte, dass das bis dato unbekannte Enzym UndA die oxidative Decarboxylierung von Laurinsäure katalysierte. UndA ist mit 261 Aminosäuren ein kleines Enzym. Das mit einer Sequenzidentität von 13% am engsten verwandte bekannte Enzym ist eine bakterielle Thiaminase.



Schema 2. Entdeckung eines Enzyms zur Herstellung von 1-Undecen durch das Screening einer Genombibliothek von *P. fluorescens* Pf-5.

UndA decarboxyliert Fettsäuren mit Kettenlängen von 10, 12 und 14 C-Atomen zu den entsprechenden ungeradzahlig 1-Alkenen. Interessanterweise setzt UndA α -Hydroxysäuren zu Aldehyden um, während β -Hydroxysäuren nicht umgesetzt werden. Eine biochemische Charakterisierung zeigte, dass UndA eine einkernige Nicht-Häm- Fe^{II} -Oxidase ist. Experimente mit aufgereinigtem UndA ergaben eine „single turnover“-Kinetik, da die Reaktion das Fe im aktiven Zentrum wahrscheinlich in einer inaktivierten, oxidierten Form zurücklässt. Die Aktivität kann über Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure oder durch die Addition von Fe^{2+} rekonstituiert werden. Kontinuierliche In-situ-Sauerstoffbildung in Kombination mit Reduktionsmitteln resultierte schließlich in multiplen molekularen Umsätzen.

Die Aufklärung der Struktur von UndA ergab ein oktaedrisches Eisen-Zentrum mit einem Fe^{2+} -Ion, das von drei Aminosäuren und drei Atomen des Substrats koordiniert wird. Eine hydrophobe Bindetasche bindet das Substrat und limitiert das Substratspektrum auf Kettenlängen von 10–14 C-Atomen. Zhang et al. postulierten einen radikalischen Mechanismus für die Decarboxylierung (Schema 3), in dem die



Schema 3. Postulierter Mechanismus für die UndA-katalysierte oxidative Decarboxylierung von Fettsäuren.

Carboxylgruppe der Säure das Eisenion bindet, wodurch ein Sauerstoffmolekül koordiniert wird. Ein Fe^{III} -Superoxid-Komplex abstrahiert das nahe (2.45 \AA) β -H-Atom des Substrats. Der Transfer einzelner Elektronen führt dann zur Freisetzung des Produkts und der Bildung einer $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ -Form, die dann über externe Reduktionsmittel in das aktive Fe^{II} -Ion überführt werden muss.

Zhang et al. präsentieren so die Struktur und den Mechanismus der neuen Nicht-Häm-Oxidase UndA mit der einzigartigen Fähigkeit, mittellange 1-Alkene zu bilden. In den letzten Jahren wurden mehrere enzymatische Mechanismen zur Synthese langkettiger Olefine entdeckt. UndA ergänzt diese Enzyme im Hinblick auf die Herstellung von 1-Alkenen mit kürzeren Kettenlängen und eröffnet die vielversprechende Perspektive einer biotechnologischen Olefinsynthese. Die Ausbeuten der Synthese von 1-Undecen in *E. coli* sind noch weit von einer industriellen Anwendung entfernt. Oxidative Enzyme können jedoch sehr effizient in Ganzzell-Biotransformationen eingesetzt werden, wie ein kürzlich entwickelter Prozess zur ω -Funktionalisierung von Methylaurat eindrucksvoll zeigt.^[1] Mehrere Patente unterstreichen, dass die Industrie das große Potenzial der biotechnologischen Synthese von Olefinen bereits erkannt hat.^[4a,f,g] UndA erweitert diesen Ansatz um mittellange Alkene und bietet so einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer industriellen Herstellung bio-basierter Alkene mit dem Potenzial, unsere Abhängigkeit von fossilen Ressourcen signifikant zu mindern.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 4156–4158
Angew. Chem. **2015**, 127, 4228–4230

- [1] M. Schrewe, N. Ladkau, B. Bühler, A. Schmid, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 1693–1697.
- [2] W. Wang, X. Lu, *Synth. Biol.* **2013**, 1, 10.
- [3] R. McKenna, D. R. Nielsen, *Metab. Eng.* **2011**, 13, 544–554.
- [4] a) M. F. Alibhai, M. A. Rude, A. W. Schirmer, (LS9 Inc.), WO 2009085, **2009**; b) M. A. Rude, T. S. Baron, S. Brubaker, M. Alibhai, S. B. Del Cardayre, A. Schirmer, *Appl. Environ. Micro-*

biol. **2011**, 77, 1718–1727; c) Y. Liu, C. Wang, J. Yan, W. Zhang, W. Guan, X. Lu, S. Li, *Biotechnol. Biofuels* **2014**, 7, 28; d) J. Belcher, K. J. McLean, S. Matthews, L. S. Woodward, K. Fisher, S. E. Rigby, D. R. Nelson, D. Potts, M. T. Baynham, D. A. Parker, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 6535–6550; e) I. Zachos, S. Gaßmeyer, D. Bauer, V. Sieber, F. Hollmann, R. Kourist, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 1918–1921; f) A. Alcasabas, P. I. Darley, P. Pir (Shell Oil Company), US 20140206057A1, **2014**; g) S. Schaffer, J. Gielen, N. Decker, N. Kirchner, T. Haas, M. Pötter, H. Häger (Evonik Degussa GmbH), PCT/EP2012/065933, **2012**.

- [5] a) A. Schirmer, M. A. Rude, X. Z. Li, E. Popova, S. B. del Cardayre, *Science* **2010**, 329, 559–562; b) F. Schneider-Belhaddad, P. Kolattukudy, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 377, 341–349.
[6] Z. Rui, X. Li, X. Zhu, J. Liu, B. Domigan, I. Barr, J. H. D. Cate, W. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 18237–18242.

Eingegangen am 17. Januar 2015

Online veröffentlicht am 16. Februar 2015