

GenoMik-Kompetenznetzwerk Göttingen

BiotechGenoMik auf dem Weg ins fünfte Jahr seiner Arbeit



Das GenoMik-Kompetenznetzwerk „Genomforschung an Bakterien für die Analyse der Biodiversität und die Nutzung zur Entwicklung neuer Produktionsverfahren“ mit dem Zentrum an der Georg-August-Universität Göttingen wurde im Sommer 2001 gegründet. Da sein Titel zwar zutreffend, aber sehr lang ist, nennen wir es jetzt „BiotechGenoMik“; darunter sind zur Zeit 22 Projektgruppen angesiedelt, die an 12 Universitäten bzw. Forschungszentren arbeiten. Es war und ist das Ziel von BiotechGenoMik, Mikroorganismen zu untersuchen, die für biotechnische Produktionsprozesse interessant sind bzw. interessant zu werden versprechen. Darüber hinaus war und ist es das Ziel, wenigstens einen Teil der biotechnisch interessanten Schätze zu heben, die nicht über kultivierbare Mikroorganismen zugänglich sind und nur über Genbibliotheken direkt aus der Natur erfasst und untersucht werden können.

In den ersten Jahren des Bestehens von BiotechGenoMik standen Erfolge in der vollständigen Sequenzierung von Genomen z.B. von *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Picrophilus torridus*, *Gluconobacter oxydans* und *Ralstonia eutropha* im Vordergrund. Indem diese Sequenzen genutzt und DNA-Microarrays verfügbar wurden sowie bestimmte Enzymsysteme in Kenntnis der Sequenz isoliert und untersucht werden konnten, verschob sich das Spektrum herausragender Resultate, und ein Beleg dafür sind die Highlights aus der Arbeit von BiotechGenoMik, die hier präsentiert werden. Sie dokumentieren, dass der Weg von der Genomsequenz zum Produkt, freilich über eine Reihe von Schritten, der Richtige ist. Mit den heutigen Möglichkeiten der bioinformatischen Analyse von Sequenzen lässt sich das für eine Mikroorganismenart charakteristische Eigenschafts- und Leistungsprofil beschreiben und für experimentelle Vorgehensweisen mit dem Ziel der Verbesserung und Entwicklung von Produktionsorganismen nutzen.

Funktionelle Genomanalyse bedeutet Kooperation, da ein ganzes Spektrum von analytischen, biochemischen, physiologischen und bioinformatischen Methoden zur Anwendung kommen muss, um die erforderlichen Daten zu gewinnen. Es wird als ein großer Vorteil gewertet, dass sich innerhalb von BiotechGenoMik eine Reihe von sehr produktiven Kooperationen entwickelt hat. So fließen die erwähnten Methoden zusammen, bei der Bearbeitung von *Bacillus licheniformis* durch Arbeitsgruppen in Greifswald, Göttingen und Düsseldorf; das aus drei Replikons bestehende Genom von *Ralstonia eutropha* wird in Berlin, Göttingen und Münster bearbeitet; Arbeitsgruppen in Berlin, Göttingen und Jülich dringen in die vielfältigen Oxidationsgeheimnisse von *Gluconobacter oxydans* ein; die Folgen der extremen Säuretoleranz von *Picrophilus torridus* für die Beschaffenheit seiner Proteine werden in Hamburg-Harburg und Göttingen ermittelt. So können Fragenstellungen, wie beispielsweise die zur Regulation der Proteinsekretion durch eingehende Analyse der Genomsequenz verbunden mit Transkriptions- und Proteomprofilen beantwortet werden. Entsprechende Untersuchungen werden an kontinuierlich wachsenden Kulturen bzw. solchen, die möglichst industrienahe im Batch-Verfahren gezüchtet werden, durchgeführt.

In den 80er Jahren erfuhren Prozesse wie die Aceton-Butanol-Gärung, die in Ländern mit hoher Maisstärke-Produktion bis 1945 in großem Umfang zur Versorgung der chemischen Industrie mit Ausgangsmaterialien beigetragen hatte, eine Renaissance. Trotz erheblicher Fortschritte im Verständnis dieser Prozesse und bei ihrer Optimierung konnten sie im Licht der damaligen Rohölpreise nicht auf eine wirtschaftlich vertretbare Grundlage gestellt werden. Angesichts einer Verdopplung der Rohölpreise kann man jetzt an ein „zurück zur Zukunft“ denken. In diesem Zusammenhang

wird der Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung von Butanol aus billigem Synthesegas große Bedeutung beigemessen, weil dadurch die Tür geöffnet werden könnte, auch an die Weiterentwicklung von Prozessen auf Maisstärkebasis zu denken. Die hier zu lösenden Probleme sind andere als die für die Produktion von Enzymen, biologisch abbaubaren Polymeren oder unvollständigen Oxidationsprodukten, die oben erwähnt wurden. Sie sind aber ein wichtiger Bereich innerhalb von BiotechGenoMik, das sich eben noch mit anderen Problemen auseinandersetzen hat als der funktionellen Genomanalyse, so beispielsweise mit der Auffindung von Bakterien mit einer hohen Toleranz gegenüber Kohlenmonoxid.

Schließlich wäre unser Netzwerk BiotechGenoMik nicht umfassend genug, wenn wir den Teil mikrobieller Komplexität ausgeklammert ließen, der sich nicht durch Isolierung und Kultur von Mikroorganismen erschließen lässt. Durch Metagenomik kann man in das Unbekannte vorstoßen; man muss jedoch das richtige Methodenrepertoire anlegen, um an Produkte zu kommen, auf die gewartet wird, oder an solche, die gegenüber verfügbaren Produkten Vorteile besitzen. Hier liegt ein großes Entwicklungspotenzial, das bei einer Fortsetzung der GenoMik-Initiative in Form von GenoMik-Plus noch größeres Gewicht erhalten soll.

Wir hoffen, dass unsere diesjährigen Highlights Ihr Interesse finden.

Kontakt

Prof. Dr. Gerhard Gottschalk,
Kordinator von BiotechGenoMik
BiotechGenoMik Netzwerk Göttingen
Institut für Mikrobiologie und Genetik
Georg-August-Universität Göttingen
Grisebachstr. 8, 37077 Göttingen
Internet: www.genomik.uni-goettingen.de

Gene, die als Marker für Stress dienen, helfen, die Effizienz des Waschmittelenzym-Produzenten *Bacillus licheniformis* zu steigern

Michael Hecker, Thomas Schweder, Birgit Voigt, Le Thi Hoi, Britta Jürgen, Karl-Heinz Maurer, Stefan Evers, Armin Ehrenreich, Gerhard Gottschalk

Das Bakterium *Bacillus licheniformis* ist einer der wichtigsten Produktionsorganismen der so genannten „weißen Biotechnologie“. Er wird weltweit als Stamm für die Herstellung extrazellulärer Enzyme, insbesondere Proteasen und Amylasen, eingesetzt. Für die industrielle Produktion von Enzymen werden an einen Wirtstamm sehr hohe Anforderungen gestellt: Er soll hohe Enzymausbeuten in kurzen Fermentationszeiten liefern und dabei auf möglichst kostengünstigen Nährmedien wachsen. Er sollte Enzyme in großen Mengen ins Medium sekretieren können. Zudem sollten wenig störende Nebenprodukte wie andere extrazelluläre Enzyme, Toxine oder Schleimstoffe gebildet werden. Als Produktionsorganismus kommt *B. licheniformis* diesen Anforderungen sehr nahe. Die funktionelle Genomanalyse wird dazu beitragen, die Produktivität dieses bedeutenden industriellen Mikroorganismus weiter zu verbessern sowie neue Verfahren zu etablieren. Um die physiologischen Vorgänge während der industriellen Fermentation von *B. licheniformis* auf molekularer Ebene umfassend charakterisieren zu können, war die Entschlüsselung der Genomsequenz durch die Göttinger Gruppe von entscheidender Bedeutung (1).

Diese Sequenzinformation dient nun als Grundlage für die funktionelle Genomanalyse in Greifswald, die in enger Kooperation mit der Göttinger Arbeitsgruppe sowie der Henkel KGaA durchgeführt wird. So wurde in Göttingen ein DNA-Microarray hergestellt, mit dem man die Transkription von 95% aller in der Genomsequenz von *B. licheniformis* annotierten Gene unter verschiedensten Bedingungen messen kann. Die Göttinger Gruppe konzentriert sich auf Untersuchungen zu prozessrelevanten Eigenschaften des Energie- und Zentralmetabolismus von *B. licheniformis*, der sich in einigen wichtigen Aspekten vom Stoffwechsel des gut untersuchten Modellorganismus *B. subtilis* unterscheidet: So kann *B. licheniformis*

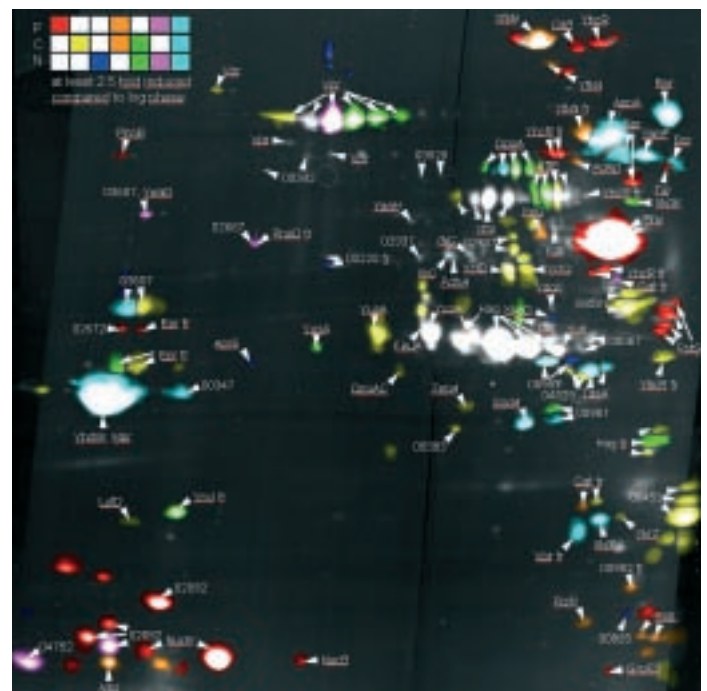
die Endprodukte der für diese Organismen charakteristischen unvollständigen Oxidation von Glucose – Acetat und 2,3-Butandiol – in einer zweiten Wachstumsphase verwerten. Außerdem kann dieser Organismus fermentativ unter anaeroben Bedingungen gut wachsen. Diese Eigenschaften könnten entscheidend für die gute Kultivierbarkeit von *B. licheniformis* in Hoch-Zelldichte-Fermentationen sein.

In der Greifswalder Arbeitsgruppe wurden mit Hilfe der Proteomanalyse über die zweidimensionale Gelelektrophorese kombiniert mit MALDI-ToF Massenspektrometrie zunächst Grundzüge des Stoffwechsels von *B. licheniformis* unter verschiedenen Modellbedingungen sowie unter Fermentationsbedingungen analysiert. Diese dadurch erhaltenen Untersuchungen unterstreichen, dass das Wissen um das Erbgut zwar zeigt, was die Zellen prinzipiell leisten können, die Techniken der funktionellen Genomuntersuchungen dagegen

sichtbar machen, was physiologisch in den Zellen wirklich passiert. Der Greifswalder Gruppe gelang es im Verlauf ihrer Proteom-Untersuchungen mehr als 500 Proteine der wachsenden Zellen zu identifizieren, unter ihnen die Mehrzahl der Enzyme, die an den grundlegenden metabolischen Routen beteiligt sind. Damit konnten viele Enzyme und Stoffwechselferläufe, die bereits auf der Genomsequenz basierend postuliert wurden, bestätigt werden. Die umfassende Proteominformation macht es möglich, die Stoffwechselforgänge und ihre Regulation vollständiger metabolischer Sequenzen in ihrer Gesamtheit zu studieren, was modellhaft für die Regulation der Glykolyse und des Tricarbonsäurecyclus (TCC) erfolgreich abgeschlossen wurde (2).

Im Mittelpunkt des Interesses der Greifswalder Gruppe stehen die Identifizierung und detaillierte Analyse von prozesskritischen Markergenen. Prozesskritische Situationen

Abb. 1: Color coding Image (Delta2D, www.decodon.de) des extrazellulären Proteoms von *B. licheniformis* unter Phosphat-, Glukose- und Stickstoff-Hungerbedingungen (aus Voigt et al., 2005).



können beispielsweise durch Nährstofflimitationen (z.B. Sauerstoff-, Stickstoff-, oder Phosphatmangel) sowie Sekretionsstress bzw. physikalische Stressbedingungen (z.B. Hitzestress, oxidativer oder osmotischer Stress) ausgelöst werden. Durch die Kombination von Proteomics und Transkriptomanalyse kann die Gesamtheit der Gene identifiziert werden, die spezifisch durch ein bestimmtes Umweltsignal reguliert werden. Dieser umfassende Blick auf die Physiologie der Zellen erlaubt es, die Gene/Proteine herauszufiltern, die als Indikatoren für prozesskritische Situationen dienen könnten. Diese Gene/Proteine bezeichnen wir als Markergene oder -proteine. In Abbildung 1 sind potentielle extrazelluläre Markerproteine von *B. licheniformis* für drei ausgewählte Nährstofflimitationen farblich dargestellt (3).

Die Kenntnis dieser Markergene bzw. -proteine erlaubt nun eine bessere Überwachung von industriellen Fermentationsprozessen. Durch den Einsatz geeigneter Analysemethoden können prozesskritische Situationen wie z.B. Nährstofflimitationen in dem Fermentationsprozess schnell erkannt werden. Allerdings muss dann durch Änderung der Fermentationsbedingungen zeitnah darauf reagiert werden. Elektrische DNA-Chips, die mit Sonden für prozesskritische Gene beladen sind (4), könnten in Zukunft für derartige Prozesskontrollen eingesetzt werden (5). Darüber hinaus ist die Identifizierung von streng regulierten Markergenen mit starken Promotoren für die Entwicklung neuer Expressionssysteme für *B. licheniformis* von Interesse.

Literatur

1. Veith et al. (2004) *The complete genome sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential.* *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7: 204-211
2. Voigt et al. (2004) *A proteomic view of cell physiology of Bacillus licheniformis.* *Proteomics* 4: 1465-1490
3. Voigt et al. (2005) *The extracellular proteome of Bacillus licheniformis grown in different media and under different nutrient starvation conditions.* *Proteomics, (im Druck)*
4. Jürgen et al. (2005) *Application of an electrical DNA-chip for the expression analysis of bioprocess-relevant marker genes of Bacillus subtilis.* *Biotechnol. & Bioengin. (im Druck)*
5. Feesche et al. (2003) *DNA chips used for bioprocess control.* *PCT/EP2003/009979*

Kontakt

Prof. Dr. Thomas Schweder und
Prof. Dr. Michael Hecker
[Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald](http://www.uni-greifswald.de)
E-Mail: schweder@uni-greifswald.de

Dünger aus Mikroben – Gene in *Bacillus amyloliquefaciens* entdeckt, die Pflanzen besser wachsen lassen

Rainer Borriss

Bakterien der Gattung *Bacillus* können durch Bildung von resistenten Sporen auch unter ungünstigen Bedingungen in der Umwelt nahezu unbegrenzt überdauern und sind in großer Zahl im Boden und in der pflanzlichen Wurzelzone verbreitet. Durch die Sekretion extrazellulärer Enzyme können sie sich auch makromolekulare Nährstoffe (Kohlenhydrate, Proteine) außerhalb der Zelle erschließen; durch die Produktion antibakterieller und antifungalier Wirkstoffe werden konkurrierende Mikroorganismen unterdrückt. Diese „natürlichen“ Eigenschaften werden von der Industrie für die Produktion wirtschaftlich wichtiger Exoenzyme (Proteasen, Amylasen, Glucanasen), Antibiotika und Vitamine genutzt.

In dem letzten Jahrzehnt wurden *Bacillus*-Stämme entdeckt, die sowohl das Wachstum von Nutzpflanzen („plant growth promotion“) als auch die pflanzlichen Abwehrreaktionen gegen phytopathogene Organismen („induzierte Systemresistenz“) fördern (Abb. 1).

So werden heute langlebige Sporenpräparate, z.B. von *Bacillus amyloliquefaciens*, mit Erfolg für die Ertragssteigerung im Gemüse- und Gartenbau sowie für Kartoffeln, Getreide und andere landwirtschaftliche Nutzpflanzen

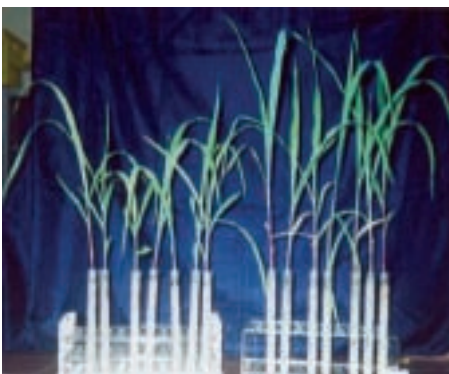


Abb. 1: Pflanzenwuchsfördernder Effekt von *Bacillus*-Stämmen: Wachstum von Maiskeimlingen ohne (links) bzw. mit (rechts) Kulturfiltrat von *B. amyloliquefaciens*

eingesetzt. Der ökologische Vorteil dieser biologischen Formulierungen, die die Einsparung beträchtlicher Mengen chemischer Dünger sowie von Herbiziden und Insektiziden erlaubt, ist offensichtlich. Heute erlebt der Einsatz derartiger Präparate in der Landwirtschaft, insbesondere in den U.S.A., einen regelrechten Boom. Leider sind die komplexen, molekularen Mechanismen, die diese Effekte in der Bakterienzelle regulieren, immer noch wenig verstanden. Ausgehend von einer strukturellen Genomanalyse gibt uns heute die Anwendung des von der Genomforschung entwickelten Methodenspektrums die Möglichkeit, die globalen Reaktionsnetze zellulärer Antworten in ihrer Gesamtheit zu untersuchen. Auf dieser Basis können neue hochproduktive Stämme für den jeweiligen Anwendungszweck entwickelt werden.

Die Genomsequenz des direkt aus der pflanzlichen Wurzelzone isolierten *Bacillus amyloliquefaciens*-Stammes, der mit Erfolg für die Förderung des Pflanzenwachstums eingesetzt wird, wurde mit der bekannten Sequenz eines verwandten „Modell“-Organismus, *Bacillus subtilis* 168, der seit ca. 150 Jahren im Labor kultiviert wird, verglichen. Es zeigte sich, dass das genetische Potential des „Wildisolats“ dem des Laborstammes überlegen ist. So wurden im *B. amyloliquefaciens*-Genom große DNA-Bereiche identifiziert, die für die Produktion von antifungalen und antibakteriellen Wirkstoffen verantwortlich und nicht im – möglicherweise „degenerierten“ – Laborstamm anzutreffen sind. Beispielsweise produziert *B. amyloliquefaciens* die cyclischen Lipopeptide Bacillomycin D und Fengycin, die Pflanzen vor phytopathogenen Pilzen in der Wurzelzone schützen (1), fördert durch die Synthese des Pflanzenhormons Indol-3-Essigsäure das Pflanzenwachstum (2) und erlaubt durch die Sekretion einer spezifischen Phosphatase („Phytase“) die Erschließung neuer Nährstoffquellen (3).

Die Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenz erlaubt die Identifizierung aller an der Exoenzym-Synthese und der für die Interaktion mit der pflanzlichen Rhizosphäre beteiligten Wirkstoffe und ebnet damit den Weg für die Optimierung von hochproduktiven *Bacillus*-Produktionsstämmen. Ein besonderer Vorteil des untersuchten *B. amyloliquefaciens* Stammes ist seine Fähigkeit, DNA auf natürlichem Wege aufzunehmen („Kompetenz“), eine Eigenschaft, die nicht nur die funktionelle Analyse mit Gen-„knock-out“-Mutanten ermöglicht, sondern auch die Etablierung eines Methodenspektrums für die weitere Untersuchung der komplexen Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Wurzelbakterien in einer Weise erlauben wird, wie es exemplarisch für die bakterielle Grundlagenforschung mit den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* seit Jahrzehnten existiert.

Literatur

1. Koumoutsis et al. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084-1096
2. Idris et al. (2004) Screening and detection of plant-growth promoting substances produced by *Bacillus subtilis*/*Bacillus amyloliquefaciens*. *Plant Disease Protection* 111: 583-597
3. Idris et al. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097-2109

Kontakt

Prof. Dr. Rainer Borriss
 Institut für Biologie
 Humboldt-Universität Berlin
 E-Mail: rainer.borriss@rz.hu-berlin.de

„Made by *Ralstonia*“ – Entwicklung neuer Produktionsstämme für eine auf Wasserstoff basierende Biotechnologie

Botho Bowien, Bärbel Friedrich und Alexander Steinbüchel

Der Einsatz von Wasserstoff (H_2) als umweltfreundlicher Energieträger wird gegenwärtig intensiv vorangetrieben. H_2 kann nicht nur im technischen Bereich verwendet werden, wie etwa in Synthesegas oder als alternativer Kraftstoff für Fahrzeuge, sondern ist auch eine hervorragende Energiequelle für viele Mikroorganismen. So kann eine Vielzahl autotropher Bakterien diese Energie zur Assimilation von Kohlendioxid (CO_2) als alleinige Kohlenstoffquelle zum Aufbau ihrer Biomasse nutzen. Das Gramnegative, fakultativ chemolitho-autotrophe Bakterium *Ralstonia eutropha* Stamm H16 ist einer der am besten untersuchten Organismen

aus der Gruppe dieser sogenannten Knallgasbakterien. Es oxidiert H_2 in Gegenwart von Sauerstoff, wobei unterschiedliche Hydrogenasen für die Aktivierung des Gases verwendet werden. Ähnlich wie in Pflanzen und Algen wird CO_2 über die Reaktionen des Calvin-Benson-Bassham (CBB)-Cyclus fixiert. Neben H_2 - CO_2 verwertet es auch eine Fülle organischer Substrate als Kohlenstoff- und Energiequellen. Nicht zuletzt hat es sich über die mittlerweile mehr als vier Jahrzehnte seiner wissenschaftlichen Erforschung als physiologisch äußerst flexibel und robuster Organismus erwiesen. Biotechnologisch ist *R. eutropha* H16 bereits als

Produzent von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) etabliert. Diese thermoplastischen Polyester werden als Speicherstoff in den Zellen angehäuft und liegen dort in Form von Granula vor. PHA finden als biokompatible und biologisch abbaubare Plastikstoffe in der Medizin und als Verpackungsmaterial Verwendung, wenn auch gegenwärtig aus Kostengründen in noch sehr geringem Umfang.

Die Perspektiven für eine weitergehende biotechnologische Nutzung von *R. eutropha* H16 sind somit vielversprechend. Zu deren grundsätzlicher Einschätzung wurde die Genomsequenzierung des Organismus im Rahmen des BMBF-Förderprogramms "Genomforschung an Mikroorganismen", Kompetenznetzwerk Göttingen (BiotechGenoMik), in Zusammenarbeit mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse (Leiter: Prof. Dr. Gerhard Gottschalk) durchgeführt. Sie hat zum Ziel, biotechnologische Anwendungen dieses Stammes auf eine rationale genetische Grundlage zu stellen. Davon ausgehend soll das physiologische Gesamtpotential von *R. eutropha* H16 neu bewertet werden.

Ein besonderes Augenmerk zukünftiger Anwendungen des Stammes wird auf der Produktion weiterer Biopolymere wie Cyanophycin, Polyglutamat und Polyaspartat sowie von Metaboliten wie organischen Säuren und Aminosäuren liegen, die für die chemisch-pharmazeutische Industrie von Interesse sind (AG

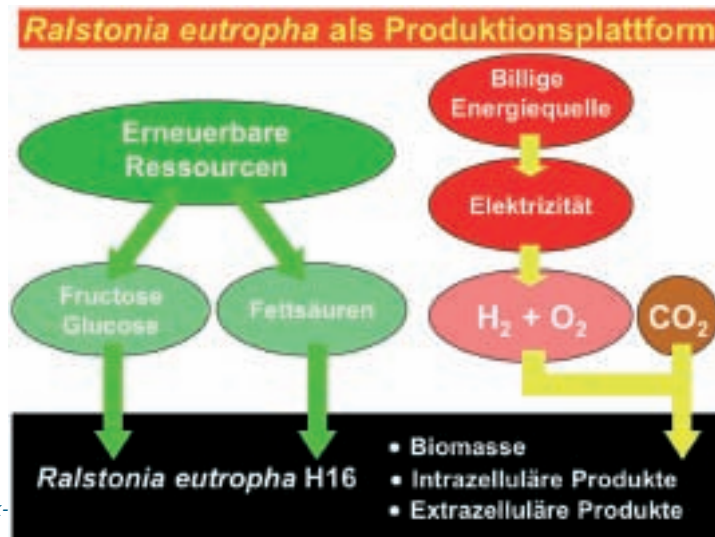


Abb. 1: Konversion von nachwachsenden Rohstoffen und von Wasserstoff mit Hilfe von *R. eutropha* H16 als Produktionsplattform.

Steckbrief: *Ralstonia eutropha* H16 (β -Proteobacteria, Familie Burkholderiaceae)

Das Genom des Stammes hat eine Größe von 7,45 Mb und besteht aus drei sich unabhängig voneinander replizierenden, ringförmigen DNA-Molekülen (1). Die Sequenz des kleinsten Replikons, des Megaplasmids pHG1 (0,452 Mb), wurde bereits aufgeklärt (2). Das Megaplasmid ist für die Lithoautotrophie des Organismus mit H_2 essentiell, weil darauf seine Hydrogenasen codiert sind. Außerdem trägt es Gene des CBB-Cyclus sowie Gene für die anaerobe Respiration und die Reduktion von Ribonucleotiden (2, 3). Nahezu alle Gene des Grundstoffwechsels befinden sich auf Chromosom 1 (4,1 Mb). Dagegen codiert Chromosom 2 (2,9 Mb) vor allem zusätzliche Stoffwechsellösungen und hat damit eher Plasmidcharakter. Es weist Duplikationen der Genregionen des CBB-Cyclus und der Nitratreduktion auf.



Abb. 2: Bioreaktor (500 L-Fermenter) im Biotechnikum des Instituts für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Münster zur Anzucht von *R. eutropha*. Insert: Zelle des Stammes H16 mit eingelagerten PHA-Grana (Aufnahme: A. Steinbüchel).

Steinbüchel). Lithoautotroph kultivierte Produktionsstämme bieten die Möglichkeit, hochreine Produkte zu erhalten. Seine Lithoautotrophie macht *R. eutropha* H16 auch zu einem besonders geeigneten Organismus für Markierung und Produktion von Biomolekülen mit stabilen Isotopen (^2H , ^{13}C , ^{15}N), die zunehmend in spektroskopischen Strukturanalysen sowie bei metabolischen Untersuchungen in der Medizin zur Anwendung kommen. Der Industriepartner Silantes GmbH, München, schaffte dazu die technologischen Voraussetzungen durch die Entwicklung sicherer Fermentersysteme, die für die Anzucht von *R. eutropha* mit H_2 unter Produktionsbedingungen unerlässlich sind.

Der gegenwärtige Stand des Projekts erlaubte bereits die Identifizierung einer Reihe interessanter Gene in der Genomsequenz von *R. eutropha* H16. So wurden neue, an der Bil-

dung von PHA-Grana beteiligte Gene entdeckt, deren gezielte Kontrolle die Produktion von PHA-Grana definierter Größe ermöglichen und somit eine Chance zur Anwendung dieser Grana in der Nanotechnologie eröffnen. Auch sind an Biosynthese und Wiederverwertung von PHA ganz offensichtlich wesentlich mehr Proteine beteiligt als bisher bekannt. Dies betrifft nicht nur die Polymerisation und Depolymerisation von PHA selbst, sondern auch die Überführung von Intermediären des Zentralstoffwechsels in Substrate der PHA-Synthase. Die Kenntnisse der entsprechenden Gene ist unabdingbare Voraussetzung, um durch 'metabolic engineering' zu verbesserten Produktionsverfahren für bereits bekannte Polymere oder gar zu neuen Polymeren wie den kürzlich entdeckten Polythioestern zu gelangen (AG Steinbüchel) (4, 5). Für das Verständnis der autotrophen CO_2 -Fixierung und des allgemeinen CO_2 -Stoffwechsels in *R. eutropha* ist das Auffinden verschiedener Gene von Carboanhydrasen von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird nach mutmaßlichen Transkriptionsregulatoren der beiden *cbb*-Operone von *R. eutropha* H16 gesucht. Gene dieser Operone codieren Enzyme des CBB-Cyclus (AG Bowien).

Bereits erfolgreich abgeschlossen wurde die Sequenzierung des Megaplasmiids pHG1, auf dem die Gene für die Synthese der drei H_2 -oxidierenden NiFe-Hydrogenasen des Organismus lokalisiert sind. Diese Hydrogenasen sind durch eine hohe Toleranz gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid gekennzeichnet. Damit besitzen sie Eigenschaften, die für den technologischen Einsatz dieser Enzyme von Bedeutung sind, z. B. für die photobiologische Produktion von H_2 und die Entwicklung einer biologischen Brennstoffzelle. Basierend auf der Sequenzbewertung wurden außerdem molekularbiologische Arbeiten zur Etablierung von Expressionssystemen und zur Stammentwicklung für geplante Produktionsverfahren durchgeführt (AG Friedrich). Darüber hinaus wurde ein Abhängigkeitssystem zur stabilen Expression von Fremdgenen in *R. eutropha* H16 bei

hohen Zelldichten entwickelt, welches auf einer Mutante mit defekter 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG)-Aldolase und einem Expressionsvektor mit intakter KDPG-Aldolase beruht (AG Steinbüchel).

Literatur

1. Schwartz et al. (2001) A physical map of the megaplasmid pHG1, one of the three genomic replicons in *Ralstonia eutropha* H16. *FEMS Microbiol. Lett.* 201: 213-219
2. Schwartz et al. (2003) Complete nucleotide sequence of pHG1. A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H_2 -based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J. Mol. Biol.* 332: 369-383
3. Bowien et al. (2002) Genetics and control of CO_2 assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* 178: 85-93.
4. Steinbüchel A. (2001) Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol. Bioscience* 1: 1-24.
5. Lütke-Eversloh et al. (2001) Biosynthesis of a new class of biopolymer: Bacterial synthesis of a sulfur containing polymer with thioester linkages. *Microbiology* 147: 11-19.

Kontakt

Prof. Dr. Botho Bowien
 Institut für Mikrobiologie und Genetik
 Georg-August-Universität Göttingen
 E-Mail: bbowien@gwdg.de

Abfallstoffe als Nahrung – Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Butanol aus billigem Synthesegas

Peter Dürre

Der Einsatz von Fermentationen zur Synthese von Grundchemikalien, die bislang kostengünstig nur auf petrochemischer Basis herzustellen waren, eröffnet völlig neue Perspektiven. Die Abhängigkeit von Erdöl wird reduziert, und in industriellen Verfahren häufig anfallende Abfallprodukte wie Schlämme, Maischen oder auch Synthesegas werden in den Produktionsprozess zurückgeführt. Die modernen Möglichkeiten des „metabolic engineering“ erlauben es, Mikroorganismen für diese Aufgabe zu optimieren.

Die Ulmer Arbeitsgruppe erarbeitet derzeit ein biotechnologisches Verfahren zur einstufigen Erzeugung von Butanol aus Synthesegas. Dieses könnte das bisher übliche 2-stufige, chemisch-technische Verfahren zur Butanolsynthese auf Erdölbasis ersetzen (Abb. 1).

Synthesegas ist eine Mischung aus etwa gleichen Teilen Kohlenmonoxid (CO) und Wasserstoff (H₂) mit Spuren anderer Gase. Es entsteht beispielsweise aus Steinkohle oder beim Thermorecycling von Abfällen und ist ein

seit langem eingesetztes, weil in großen Mengen vorhandenes und billiges Ausgangssubstrat für viele Syntheseprozesse.

Nach aufwendigen Screening-Programmen ist es gelungen, einen anaeroben Organismus zu finden, der das hochtoxische Kohlenmonoxid im Synthesegas sehr gut als Substrat verwerten kann. In dieser Tatsache liegt aber wiederum die besondere Eleganz dieses Ansatzes: Energieaufwendige Sterilisationsprozesse wären für einen derartigen Prozess wahrscheinlich nicht notwendig, da „normale“ Mikroorganismen die eingesetzten CO-Konzentrationen nicht überleben würden. Aufschluss über die biochemischen Details, die die hohe Toleranz gegenüber CO ermöglichen, liefert die momentan im Göttinger Laboratorium für Genomanalyse durchgeführte Sequenzierung des entsprechenden bakteriellen Genoms.

Durch den Ansatz des „metabolic engineering“ wird ein Stoffwechselweg für die Synthese von Butanol konstruiert und in das CO-verwertende Bakterium eingebracht. Die

entsprechenden Arbeiten zur Übertragung und Expression des Butanolsynthese-Operons stehen kurz vor Beendigung. Parallel werden weitere Bakterien wie beispielsweise *Butyribacterium methylotrophicum* und auch Umweltgardenbanken bezüglich der Gene zur Butanolsynthese untersucht. Ziel ist es, eine Butanoldehydrogenase mit hoher Aktivität zu finden, um die Butanol-Ausbeuten in einem späteren Produktionsprozess zu steigern.

Der schnelle Transfer der entwickelten Stämme aus dem Labor in einen Produktionsprozess soll durch Kooperation mit der Firma European Oxo GmbH sichergestellt werden, die ein großes Interesse an den Möglichkeiten des Verfahrens hat.

Kontakt

Prof. Dr. Peter Dürre

*Mikrobiologie und Biotechnologie,
Universität Ulm*

E-Mail: peter.duerre@biologie.uni-ulm.de

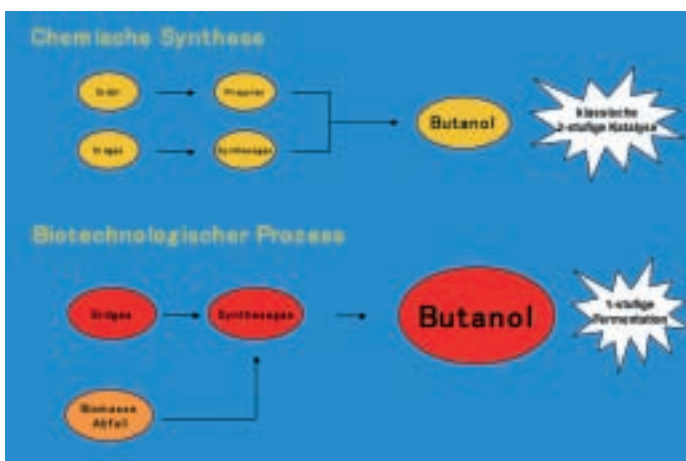


Abb. 1: Chemische und biotechnologische Butanolproduktion

Genomsequenz enthüllt das Potenzial von *Gluconobacter oxydans* für Biotransformationen

Armin Ehrenreich, Marc Hoffmeister, Birgit Veith, Tina Prust, Uwe Deppenmeier

Essigsäurebakterien wie *Gluconobacter oxydans* dienen den Menschen seit Jahrtausenden, bereits die alten Babylonier und Ägypter nutzten sie unwissentlich. Sie ließen Wein und Bier einfach offen stehen, mischten ein paar Kräuter hinzu und wie von selbst versäuerten die Getränke zu Essig. Heute weiß man, dass keinesfalls die Kräuter oder überirdische Mächte für die Verwandlung verantwortlich sind. Essigsäurebakterien sind auf pflanzlichem Material weit verbreitet, daher genügen ein paar Kräuter um die so genannte oxidative Fermentation

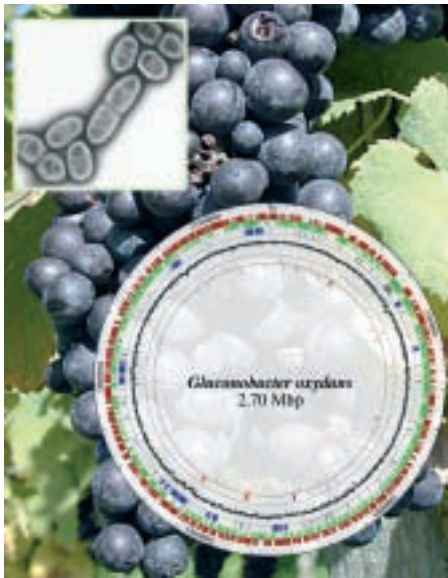


Abb. 1: Austretende, stark zuckerhaltige Pflanzensäfte an Früchten sowie Nektar oder der Darm von Bienen sind die typischen Habitate von *Gluconobacter*, dessen Zellen (siehe kleines Bild oben) eine charakteristische, zitronenförmige Morphologie aufweisen. Das Genom dieser Organismen (siehe kreisförmige Darstellung) codiert für eine Vielzahl von stereo- und regioselektiven Dehydrogenasen.

zuverlässig zu starten. In ihrem Verlauf wird Ethanol nicht zu Kohlendioxid sondern zu Essigsäure oxidiert – eine unvollständige Oxidation.

Die Einsatzmöglichkeiten der unvollständigen Oxidationen der Essigsäurebakterien wie *G. oxydans* beschränken sich jedoch nicht auf die Essigproduktion. Unvollständige Oxidationsprozesse von Zuckern und Alkoholen, die von *G. oxydans* durchgeführt werden, sind in der chemischen und pharmazeutischen Industrie von großem wirtschaftlichem Interesse. *G. oxydans* kann nicht nur Ethanol zu Acetat, sondern auch eine sehr große Zahl von Zuckern und anderen Polyolen regio- und stereoselektiv zu den entsprechenden Zuckersäuren oder Ketonen oxidieren. Der Organismus ist daher gleichsam als lebender, hochspezifischer Katalysator für eine unüberschaubare Zahl von Oxidationsreaktionen anzusehen. So wird *G. oxydans* inzwischen vermehrt für die Produktion von Feinchemikalien oder zur Synthese von Zwischenprodukten bei der Herstellung von Pharmazeutika eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von L-Sorbose aus D-Sorbit, das als wichtige Zwischenstufe zur Herstellung von Vitamin C verwendet wird.

Um den höchst außergewöhnlichen Stoffwechsel der Essigsäurebakterien zu verstehen und ihr ganzes Potential für Oxidationsreaktionen abschätzen zu können, wurde das Genom von *G. oxydans* durch die Arbeitsgruppe von Uwe Deppenmeier in enger Zusammenarbeit mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse vollständig sequenziert. Die Kenntnis der Genomsequenz trägt zum grundlegenden Verständnis des ungewöhnlichen Metabolismus der Essigsäurebakterien bei und ist Grundlage für eine funktionelle Genomanalyse. Darauf

aufbauend kann eine gezielte Veränderung des Stoffwechsels durch so genanntes „metabolic engineering“ vorgenommen werden. Dabei sollen vorhandene, auf Essigsäurebakterien beruhende Produktionsprozesse verbessert und vor allem neue biotechnologische Einsatzgebiete für diese Organismen erschlossen werden.

Die bisherigen Untersuchungen ergaben eine ganze Reihe von Überraschungen in Bezug auf den Energie- und Biosynthesestoffwechsel dieses Bakteriums. Besonders wichtig für die Arbeiten, die im Verbund mit den Arbeitsgruppen um Hermann Sahn (Jülich) und Helmut Görlich (Berlin) durchgeführt werden, sind die neuartigen Erkenntnisse über Proteine, die die erwähnten unvollständigen Oxidationen von Glukose und vieler anderer Substrate steuern. So konnten allein 75 Gene identifiziert werden, die für biochemisch nicht charakterisierte Dehydrogenasen kodieren. Die Kenntnis dieser Gene erlaubt die Entwicklung neuartiger Strategien zur maßgeschneiderten Konstruktion von besonders geeigneten Produktionsstämmen, woran das Unternehmen BASF AG (Ludwigshafen), welches diese Untersuchungen finanziell gefördert hat, besonders interessiert ist.

Literatur

1. Prust et al. (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat. Biotechnol.* 23:195-200

Kontakt

Dr. Armin Ehrenreich
 Institut für Mikrobiologie und Genetik
 Georg-August-Universität Göttingen
 E-Mail: aehrenr@gwdg.de

Steckbrief *Gluconobacter oxydans* 621H (α -Proteobacteria, Familie: Acetobacteraceae)

Das Genom von *G. oxydans* 621 H besteht aus einem ringförmigen Chromosom von 2,7 Mb Größe, sowie fünf Plasmiden von 163 kb, 26,6 kb, 14,5 kb, 13,2 kb und 2,7 kb Größe. Auf dem Genom sind insgesamt 2.668 Gene identifiziert worden.

Gluconobacter oxydans: Produzent industriell relevanter Biomoleküle

Ute Herrmann, Tina Hölscher, Helmut Görisch und Hermann Sahn

Gluconobacter oxydans, ein auf Blumen und Früchten lebendes Essigsäurebakterium, ist ein so genannter „unvollständiger Oxidierer“. Die Besonderheit dieses Organismus liegt darin, dass er so verschwenderisch mit den zur Verfügung stehenden Nährstoffen umgeht und nur wenig für sein eigenes Wachstum verwendet. Eine Vielzahl der Stoffwechselprodukte, die er ausscheidet, sind Biomoleküle, die wegen ihrer Wirksamkeit als Vitamine oder Arzneimittelbestandteile von großem wirtschaftlichem und medizinischem Interesse sind. Neben Dihydroxyaceton (Bräunungsmittel) aus Glycerin und Glukonsäure (Spülmittelzusatz) aus Glukose wird *G. oxydans* auch zur Herstellung von Aminosorbose (diabetisches Therapeutikum) aus Aminosorbit eingesetzt.

Weinsäure

Durch unvollständige Oxidation kann *G. oxydans* aus Traubenzucker 5-Ketoglukonsäure, ein Vorläufer der Weinsäure, bilden. Weinsäure ist ein gefragtes Säuerungsmittel für Fruchtsäfte, Bonbons und andere Lebensmittel, eignet sich zudem als Säure und Reduktionsmittel beim Färben und Drucken und wird in der Glasversilberung eingesetzt.

Zwei separate Enzymsysteme regeln den Umbau von Traubenzucker in 5-Ketoglukonsäure: Eines arbeitet im Inneren der Bakterienzellen, das andere ist in die Zellmembran integriert (Abb. 1). Die Gene, welche für die beteiligten Enzyme kodieren, untersuchen Her-

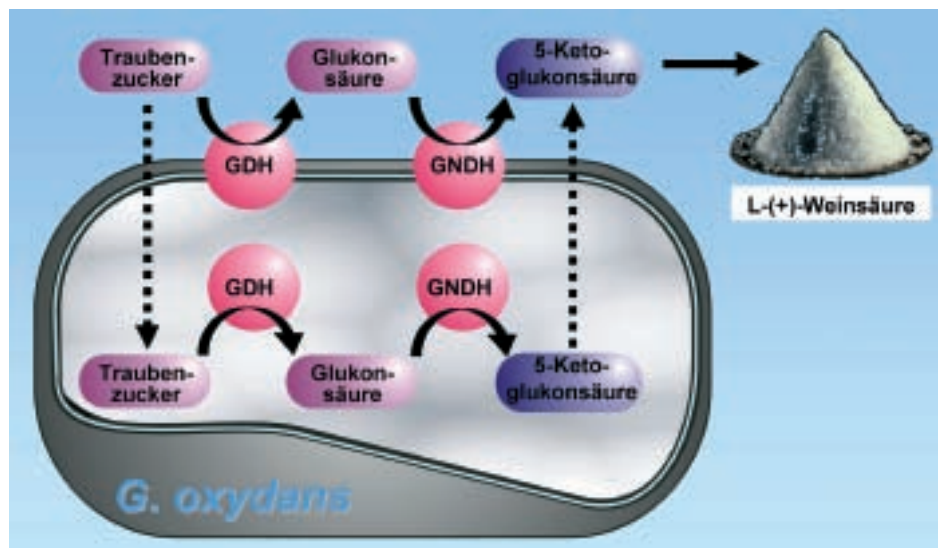


Abb. 1: Produktion von Weinsäure mit Hilfe von *Gluconobacter oxydans*

mann Sahn und Kollegen vom Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich sowie Helmut Görisch und Mitarbeiter vom Institut für Biotechnologie der TU Berlin. Die Arbeitsgruppen versuchen *G. oxydans* so zu verändern, dass 5-Ketoglukonsäure im Übermaß gebildet wird (1,2). Neben der erwünschten 5-Ketoglukonsäure produziert *G. oxydans* jedoch auch noch eine weitere Säure aus dem Traubenzucker, die verwandte 2-Ketoglukonsäure. Um das zu verhindern, wurde das Gen, dessen Protein für die Bildung der 2-Ketoglukonsäure notwendig ist, im Genom von *G. oxydans* inaktiviert. Auf diese Weise wurde tatsächlich die 2-

Ketoglukonsäurebildung vollständig unterbunden und die Produktion der 5-Ketoglukonsäure begünstigt, weil sich der Produktstrom nicht mehr auf zwei Wege verteilt (2). Im Anschluss wurde die Synthese der Proteine für die 5-Ketoglukonsäure-Bildung verstärkt, so dass die 5-Ketoglukonsäure-Konzentration auf bis zu 60 g/l stieg.

Für die Industrie sind diese Ergebnisse deshalb so interessant, weil bislang Weinsäure ausschließlich aus Weinstein (Rückstand bei der Weinherstellung) hergestellt wird und daher nur beschränkt verfügbar ist. Dabei entstehen außerdem organisch verunreinigter Gips

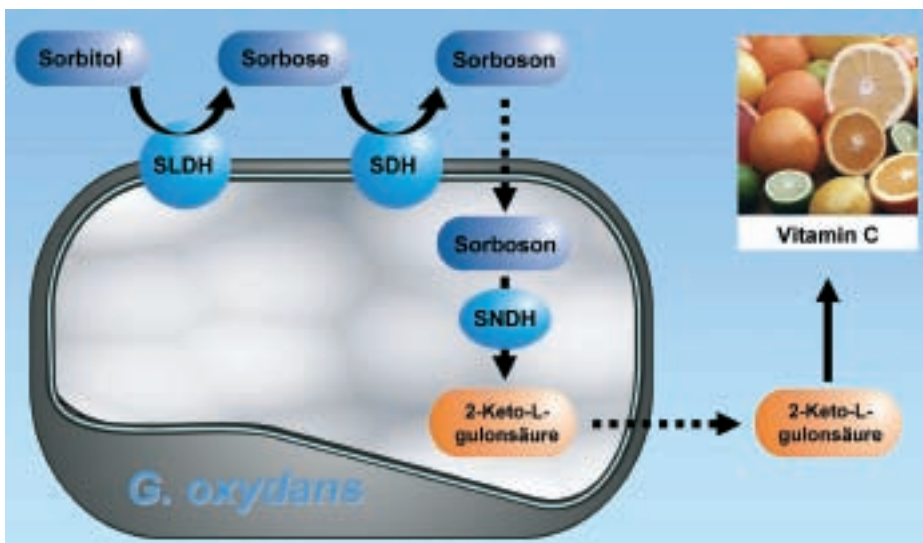


Abb. 2: Produktion von Vitamin C mit Hilfe von *Gluconobacter oxydans*

und organische Abfälle aus der Weinhefeaufbereitung, die als Sondermüll entsorgt werden müssen.

Vitamin C & PQQ

Nach erfolgreichem Abschluss des Weinsäure-Projektes wird in Jülich derzeit ein *G. oxydans*-Stamm entwickelt, der D-Sorbit, bzw. Traubenzucker zu einem direkten Vorläufer des Vitamin C, der 2-Ketogulonsäure, umsetzt. An der Umsetzung von D-Sorbit zu 2-Ketogulonsäure sind drei Enzyme beteiligt. Hermann Sahn und Mitarbeitern ist es mittlerweile gelungen einen *G. oxydans*-Stamm zu kon-

struieren, der alle für die Umsetzung von Sorbit zu 2-Keto-L-gulonsäure essentiellen Gene funktionell exprimiert.

In Berlin hingegen steht das neue Vitamin Pyrrolochinolinchinon (PQQ), das als Kofaktor vieler Quinoprotein-Dehydrogenasen dient, im Zentrum der Untersuchungen (3). Erste Ergebnisse zur Überexpression des *pqq*-Genclusters waren erfolgreich und führten nach Kultivierung der rekombinanten *G. oxydans*-Stämme zur Anreicherung von PQQ im Medium.

Literatur

- Herrmann U, et al. 2004. Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:86-90.
- Elfari M, et al. 2005. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:668-674.
- Kay CW, et al. 2005. Substrate-binding in quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* studied by electron paramagnetic resonance at 94 GHz. *J. Am. Chem. Soc.* 127:7974-7975.

Kontakt

Hermann Sahn
 Institut für Biotechnologie 1,
 Forschungszentrum Jülich GmbH
 E-Mail: h.sahn@fz-juelich.de

Umweltgenomik (Metagenomik) als nahezu unerschöpfliche Quelle für neue Biokatalysatoren, Stoffwechselwege und Wirkstoffe

Wolfgang Streit, Karl-Erich Jaeger, Rolf Daniel und Ken Timmis

Es sind nicht die Menschen, die Tiere oder – wie man vielleicht annehmen möchte – die Insekten, die die Welt dominieren – die Wahrheit ist mikroskopisch klein. Mikroorganismen dominieren die Biosphäre und besitzen eine erstaunlich hohe physiologische, metabolische und genetische Vielfalt. Die Gesamtzahl der verschiedenen prokaryotischen Arten auf der Erde wird auf etwa 1 bis 100 Millionen geschätzt, wobei bisher jedoch nur ein Bruchteil (<1%) dieser Mikroorganismen mit Standardmethoden kultiviert werden kann. Dies liegt unter anderem daran, dass die meisten Organismen unter Laborbedingungen nicht wachsen, da ihre Nährstoffansprüche zu komplex sind. Die Forscher im Netzwerk verlassen sich daher nicht länger auf die etwa 6.000 Mikroorganismen, die in den letzten 100 Jahren Biologie in den Labors kultiviert wurden, oder die 600 Einzelorganismen, deren Genome bisher entschlüsselt wurden. Vielmehr haben die Autoren hier einen eigenen Weg entwickelt, um die Vielfalt der Mikroorganismen zu erschließen. Die Forscher im Netzwerk nutzen die **Metagenomik** als eine neue Stufe der Genomforschung, um die Vielfalt der Mikroorganismen in mikrobiellen Habitaten zu erschließen. Die biologi-

sche Vielfalt, die dabei genutzt werden kann, ist nahezu unerschöpflich und auch kaum vorstellbar: Wie groß diese biologische Diversität tatsächlich ist, lässt sich am Besten abschätzen, wenn man sich das Leben in einem Gramm Gartenerde anschaut. Man muss davon ausgehen, dass in einem Gramm Erde einige tausend unterschiedliche prokaryotische Mikroorganismen leben. Dies bedeutet im Vergleich deutlich mehr Gesamtgenominformation in einem Gramm Erde als im menschlichen Genom. Diese enorme Informationsfülle war wegen fehlender Kultivierungstechniken bisher jedoch nicht oder nur geringfügig für biotechnologische oder pharmazeutische Fragestellungen nutzbar. Dieses Problem konnte im Wesentlichen durch die konsequente Anwendung und Weiterentwicklung von Metagenomtechnologie gelöst werden.

Der Trick, den die Metagenomik anwendet, ist, dass sie die Genominformation – also das Erbgut aller Mikroorganismen eines Standortes – erschließt ohne diese zu kultivieren. Dazu wird die gesamte DNA direkt aus Umweltproben, Biofilmen oder Anreicherungskulturen isoliert und als Genbibliothek in heterologen Wirten – typischerweise dem Darmbakterium *Escherichia coli* – hinterlegt. Bei der Auswahl der Umweltproben sind die Forscher sehr wählerisch und scheuen auch keine Kosten und Mühen, um an viel versprechende Probenmaterialien von allen Teilen der Erde zu gelangen. Die Umweltproben, die bisher bearbeitet wurden, reichten von einfachen Trinkwasserbiofilmen, Proben aus Gartenteichen, Gletschereis von der Zugspitze, über eher exotische Proben aus Erzabbaugebieten oder heißen Quellen, bis hin zu Sedimentproben aus dem Wattenmeer. Im Idealfall enthält eine Metagenombank den Hauptanteil der gesamten genomischen Information der analysierten mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Die so hinterlegte Erbinformation kann dann beliebig vermehrt, untersucht und letztendlich auch wirtschaftlich genutzt werden.

Die bisher in dieser Forschungsrichtung durchgeführten Arbeiten belegen, dass in der Klonierung von Umwelt-DNA und der anschließenden Durchmusterung der daraus resultierenden Metagenombanken ein enormes Potential zur Entdeckung von neuartigen Biokatalysatoren und Wirkstoffen liegt. Bisher wurden durch diese Art der Arbeiten in den Labors der Autoren eine Reihe von sehr außergewöhnlichen und für eine Industrieanwendung viel versprechende Enzyme isoliert. Beste Beispiele hierfür sind die Identifizierung von Lipasen und alkaliphilen Proteasen, die als Waschmittelzusatz zur Entfernung von Fett- bzw. Eiweißverschmutzungen eingesetzt werden können. Einige der bisher gefundenen Lipasen und Esterasen zeichnen sich darüber hinaus auch durch hochinteressante Substratspektren aus und werden derzeit vom Industriepartner, der BRAIN AG (Zwingenberg), auf eine mögliche Verwertung hin geprüft. Eine der gefundenen Esterasen könnte beispielsweise für die Herstellung von Parfums Verwendung finden oder für die Gewinnung des Pfefferminzgeschmackstoffs im Kaugummi. Eine große ökonomische Bedeutung und einen breiten Anwendungsbereich haben auch die isolierten amylolytischen Enzy-

Die bisher in dieser Forschungsrichtung durchgeführten Arbeiten belegen, dass in der Klonierung von Umwelt-DNA und der anschließenden Durchmusterung der daraus resultierenden Metagenombanken ein enormes Potential zur Entdeckung von neuartigen Biokatalysatoren und Wirkstoffen liegt. Bisher wurden durch diese Art der Arbeiten in den Labors der Autoren eine Reihe von sehr außergewöhnlichen und für eine Industrieanwendung viel versprechende Enzyme isoliert. Beste Beispiele hierfür sind die Identifizierung von Lipasen und alkaliphilen Proteasen, die als Waschmittelzusatz zur Entfernung von Fett- bzw. Eiweißverschmutzungen eingesetzt werden können. Einige der bisher gefundenen Lipasen und Esterasen zeichnen sich darüber hinaus auch durch hochinteressante Substratspektren aus und werden derzeit vom Industriepartner, der BRAIN AG (Zwingenberg), auf eine mögliche Verwertung hin geprüft. Eine der gefundenen Esterasen könnte beispielsweise für die Herstellung von Parfums Verwendung finden oder für die Gewinnung des Pfefferminzgeschmackstoffs im Kaugummi. Eine große ökonomische Bedeutung und einen breiten Anwendungsbereich haben auch die isolierten amylolytischen Enzy-

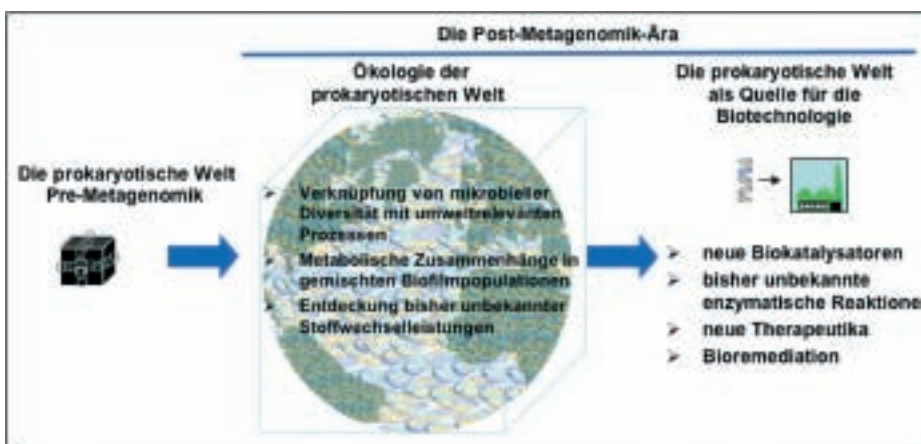


Abb. 1.: Metagenomik erhellt die "black box" der prokaryotischen Welt. Dabei bezeichnet der Begriff 'Metagenom' die gesamte Erbinformation aller Mikroorganismen eines Standortes.

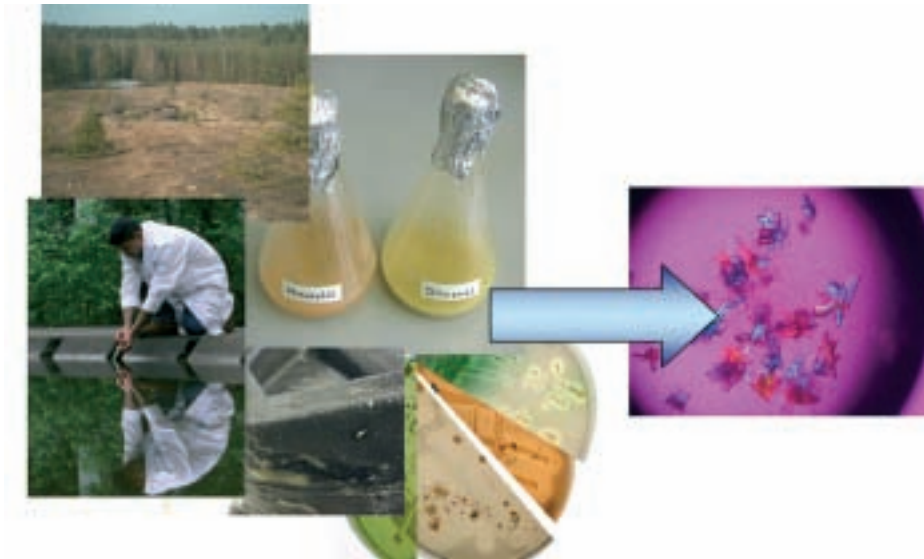


Abbildung 2: Neue Biokatalysatoren und Wirkstoffe aus Umweltproben, Biofilmen und Anreicherungen.

me, die in der Stärkeverzuckerung, im Brauwesen, in der Alkoholproduktion und in der Textilindustrie verwendet werden können. Hier sind sehr temperaturstabile und salztolerante Enzyme gefunden worden, deren Einsatz derzeit unter extremen und industriennahen Bedingungen getestet wird. Darüber hinaus eröffnen die in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner isolierten Oxidoreduktasen und Hydratasen den Zugang zur Synthese von industriell-relevanten chiralen Alkoholen, die mit Hilfe der organischen Chemie nur schwer herstellbar sind.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die verwendeten metagenomischen Verfahren in Kombination mit effektiven Durchmusterungstechnologien zur Isolierung von neuen robusten Biokatalysatoren mit hohem Anwendungspotential führen. Diese Vorgehensweise wird sich daher in den kommenden Jahren als Standardmethode für die Suche nach neuen industriell-relevanten Biokatalysatoren und Verbindungen durchsetzen.

Zusätzlich zu diesen schon fast klassischen Durchmusterungen der Umweltgenbanken nach Biokatalysatoren machen sich die Autoren nun auch auf die Suche nach neuarti-

gen Wirkstoffen und Therapeutika. Dabei sind die Autoren sehr daran interessiert, Wirkstoffe bzw. neue Gene für Wirkstoffe zu finden, die zur Vermeidung von mikrobiellen Biofilmen genutzt werden können. Biofilme, sind mikrobielle Aufwüchse, die ubiquitär vorkommen, jedoch in unserem unmittelbaren Umfeld unerwünscht sind. In industriellen Prozessen stören sie meist Produktionsprozesse und im klinischen Bereich sind sie häufig Auslöser von Infektionen und müssen daher frühzeitig erkannt und bekämpft werden. Ein Problem dabei ist jedoch, dass Mikroorganismen in Biofilmen sehr resistent gegenüber klassischen Antibiotika und Bioziden sind. Daher möchten die Metagenomforscher nun neue Wirkstoffe aus Metagenomen gewinnen. Da Biofilmwachstum als solches sehr geordnet abläuft und Mikroorganismen miteinander kommunizieren, um im Biofilm zu wachsen, suchen die Forscher jetzt mit Hilfe der Metagenomik nach Möglichkeiten, die Kommunikation von Mikroorganismen zu stören. Dieses Wissen wollen die Wissenschaftler dann einsetzen, um gezielt Wirkstoffe zur Vermeidung der Biofilmbildung zu entwickeln.

Neben der Isolierung von neuen Biokatalysatoren und Anti-Biofilmwirkstoffen wur-

den auch neue molekulare Werkzeuge und Methoden entwickelt, die eine effiziente und schnelle Durchmusterung von Genbanken mit hoher Komplexität erlauben. Dazu gehört beispielsweise die Nutzbarmachung neuer Wirtstämme für das Anlegen der Metagenom-Genbanken. Hier arbeiten die Autoren mit Hochdruck an zwei neuen Wirten: *Escherichia blattae* und *Burkholderia glumae*. Für diese Arbeiten wurden die kompletten Genome beider Organismen entschlüsselt, und für beide Organismen werden derzeit Vektoren und andere genetische Werkzeuge erstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Metagenomik als neue und junge Forschungsrichtung bereits heute eine Schlüsseltechnologie darstellt, die schon jetzt bewiesen hat, dass sie brauchbare Lösungen für biotechnologische und darüber hinausgehende Fragestellungen liefern kann.

Literatur

1. Daniel, R. (2005) *The metagenomics of soil*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 470-478
2. Steele et al. (2005) *Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology*. *FEMS Microbiol. Lett.* 247: 105-111
3. Streit et al. (2004) *Metagenomics - the key to the uncultured microbes*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 492-498
4. Daniel, R. (2004) *The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 199-204
5. Streit et al. (2004) *Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 285-290
6. Voget et al. (2003) *Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6235-6242

Kontakt

Prof. Dr. W. Streit
 AG Molekulare Enzymtechnologie,
 FB Chemie, Universität Duisburg-Essen
 E-Mail: wolfgang.streit@uni-due.de

Die Sequenzierung und funktionelle Analyse des Genoms des säure- und hitzebeständigen Archaeons *Picrophilus torridus* liefert die Information für neuartige Biokatalysatoren

Wolfgang Liebl und Garo Antranikian

Manche prokaryotische Mikroorganismen (Bakterien und Archaeen) können unter höchst erstaunlichen, aus menschlicher Sicht extremen Bedingungen gedeihen: etwa in extrem saurem oder alkalischem Milieu (um pH 0 bzw. bis etwa pH 13, Acidophile bzw. Alkaliphile), bei hohen Salzkonzentrationen (Halophile), bei extrem hohem Druck (Piezophile) oder bei sehr tiefen oder hohen Temperaturen (nahe 0°C bzw. bis etwa 110°C, Psychrophile bzw. extrem Thermophile). Die molekularen Mechanismen, die es erlauben, unter derart widrigen Bedingungen

zu leben, beinhalten spezifische Anpassungen auf den Ebenen von

- Struktur und Funktion von Biomolekülen und (sub)zellulären Strukturen,
- Physiologie und Stoffwechsel
- Regulation von Genexpression und Bewahrung der Integrität der genetischen Information.

Der Wunsch, die Mechanismen der extremophilen Anpassung zu verstehen, sowie die Suche nach neuen, stabilen Biokatalysatoren für biotechnologische Anwendungen sind die Triebfe-

dern der derzeitigen Forschung an extremophilen Mikroorganismen.

Im Rahmen des Göttinger BiotechGenoMik-Netzwerkes führen wir Genomsequenz-basierte Untersuchungen an *Picrophilus torridus* durch, einem Organismus, der gleich zwei Extreme in sich vereint, nämlich extreme Acidophilie und (moderate) Thermophilie. Dieses Archaeon wächst optimal bei pH 0,7 und damit am äußersten Rande des pH-Spektrums des Lebens und ist gleichzeitig mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 60°C auch noch

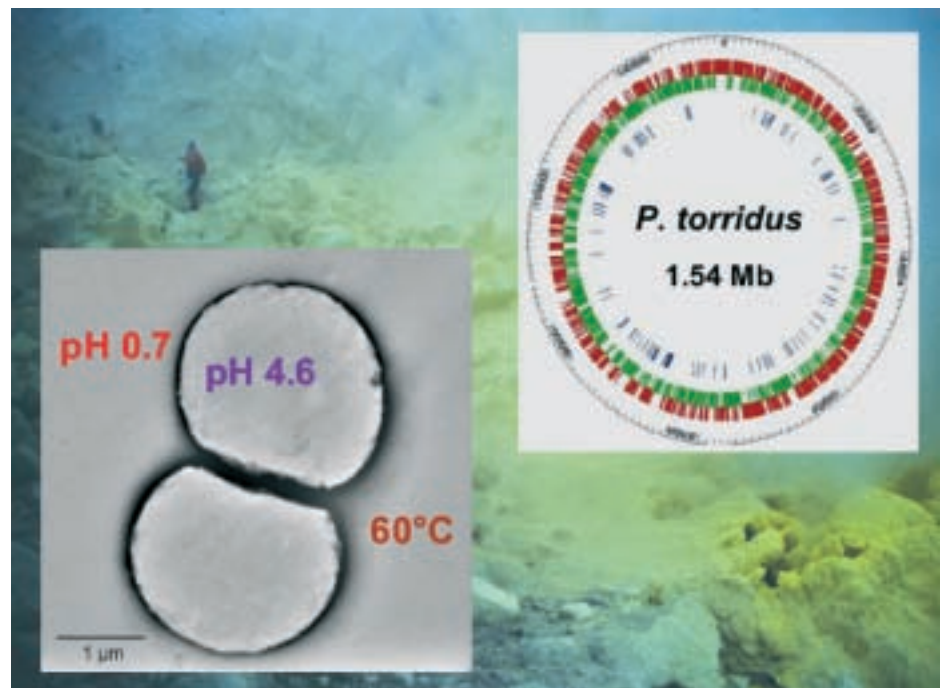


Abb. 1: Heißer, saurer Standort beim Vulkan Mount Yo, Japan, nahe der Stelle, an der *Picrophilus torridus* (elektronenmikroskopische Aufnahme von in Teilung befindlichen Zellen unten links) erstmals isoliert wurde. Fotos: C. Schleper, M. Hoppert.

Steckbrief *Picrophilus torridus* (Archaeon, Ordnung Thermoplasmatales, Familie Picrophilaceae)

Das ringförmige Genom von *P. torridus* besitzt eine Größe von 1.545.900 Basenpaaren mit einem G+C-Gehalt von 36% und einer Gesamtzahl von 1539 ORFs. 92% des Genoms stellen kodierende Sequenzen dar, womit *P. torridus* die höchste Kodierungsdichte unter den Genomen von Thermoacidophilen besitzt.

thermophil. Das intrazelluläre Milieu in *Picrophilus*-Zellen weist mit pH 4,6 sogar den niedrigsten pH-Wert auf, der je in lebenden Zellen gefunden wurde.

Gemeinsam mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse (G2L) wurde die vollständige Nukleotidsequenz des Genoms von *P. torridus* ermittelt (1). Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden editiert und umfassend annotiert, um den aufgefundenen offenen Leserahmen (ORFs) mögliche Funktionen zuzuordnen und die wesentlichen Stoffwechselwege postulieren zu können.

Möglicherweise haben die extremen Lebensbedingungen im Fall von *Picrophilus* im Laufe der Evolution zu einem relativ kleinen Genom mit hoher Informationsdichte geführt. Aus der Genomanalyse ergaben sich diverse weitere Hinweise auf mögliche Strategien der thermoacidophilen Anpassung dieses Archaeons. Einen Schwerpunkt des Projektes bildet die Untersuchung von ausgewählten *P. torridus* Proteinen. Vor allem Enzyme mit niedrigem pH-Optimum und hoher Stabilität sind für die Lebensmittelindustrie (z.B. Proteasen, Polysaccharid- und Oligosaccharid-abbauende Enzyme) und für die chemische Industrie (z. B. Esterasen, Lipasen, Dehydrogenasen) von Interesse. Ein beeindruckendes Beispiel für ein extrem angepasstes Enzym von *P. torridus* ist dessen Glucoamylase, die optimal bei pH 2 arbeitet und zudem bei hohen Temperaturen aktiv und stabil ist (2). Für die rekombinante Herstellung von *P. torridus* Enzymen werden

verschiedene heterologe Expressionssysteme erprobt. Dabei werden nicht nur diverse Expressionsvektoren sondern auch andere Wirtsorganismen als *E. coli* wie Hefe, *Sulfolobus*, *Thermus*, *Gluconobacter*, *Corynebacterium* oder *Bacillus* einbezogen. Verschiedene Gene für Glycosidasen, Esterasen und Dehydrogenasen (3) konnten inzwischen erfolgreich exprimiert werden, die entsprechenden Biokatalysatoren werden derzeit biochemisch charakterisiert, um anschließend in Kooperation mit Industriepartnern ihr biotechnologisches Potential ausloten zu können.

Literatur

1. Fütterer et al. (2004) Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 9091-9066
2. Serour et al. (2002) Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 73-83
3. Angelov et al. (2005) Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*. *FEBS J (Eur J Biochem)* 272: 1054-62

Kontakt

Prof. Dr. Wolfgang Liebl
Institut für Mikrobiologie und Genetik,
Georg-August-Universität
E-Mail: wliebl@gwdg.de