

# Die mikrobielle Diversität als Quelle für neuartige Biokatalysatoren: Konstruktion und Durchmusterung von Metagenombanken

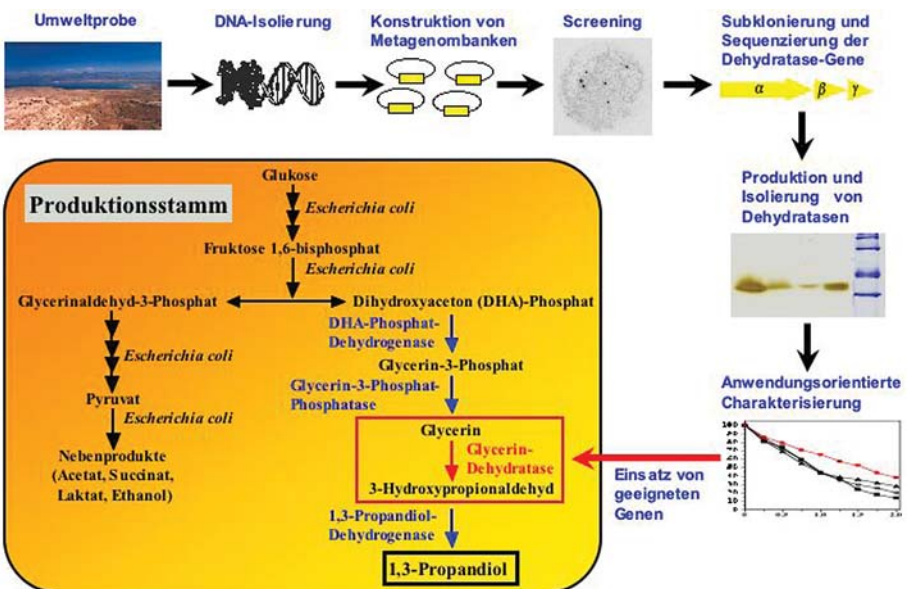
Rolf Daniel, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen

► Die Metagenomik als neue Stufe der Genomforschung an Prokaryoten erschließt die natürliche Komplexität von Mikrobengemeinschaften als umfangreiche Ressource sowohl für die Anwendung als auch für die Forschung. Unabhängig von der Kultivierbarkeit der Mikroorganismen wird dabei die mikrobielle DNA direkt aus Umweltproben oder komplexen Anreicherungskulturen isoliert und als rekombinante Genbibliothek (Metagenombank) in heterologen Wirten präsentiert. Die verfügbare Biodiversität eines Standortes, niedergelegt als genetische Ressource, kann beliebig vermehrt, untersucht und wirtschaftlich genutzt werden. Die bisher publizierten Arbeiten belegen, dass in der direkten Klonierung von Umwelt-DNA und der anschließenden Durchmusterung der daraus resultierenden Metagenombanken ein enormes Potenzial zur Entdeckung von neuartigen Biokatalysatoren liegt<sup>[1, 2, 3]</sup>. Die bisher auf diesem Wege isolierten Gene bzw. Genprodukte waren meistens völlig neuartig oder zeigten nur ge-

ringe Verwandtschaft zu denen, die aus kultivierten und charakterisierten Mikroorganismen isoliert wurden<sup>[1, 3]</sup>.

Für die Durchmusterung der Metagenombanken können zwei Wege beschrrieben werden. Sie kann zum einen auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten durchgeführt werden<sup>[4]</sup>. Hierdurch gelingt es, neue Enzyme bekannter Proteinfamilien oder funktioneller Klassen zu identifizieren. Besonders viel versprechend ist zum anderen ein auf Aktivität basierendes und damit sequenzunabhängiges Screening. Hierdurch können strukturell neue Enzyme, die eine bestimmte Reaktion katalysieren, und bislang unbekannte Enzymaktivitäten entdeckt werden. Dies führte z.B. zur Klonierung von Genen für neuartige Lipasen, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter und Alkohol-Oxidoreduktasen<sup>[2, 3, 5, 6]</sup>.

Im Folgenden wird das Potenzial der Metagenomik zur Entdeckung von biotechnologisch relevanten Enzymen am Beispiel der Coenzym B<sub>12</sub>-abhängigen Glycerin- und der dazu verwandten Diol-Dehydratase



Auffindung von Genen für B<sub>12</sub>-abhängige Glycerin- und Diol-Dehydratasen mit Anwendungspotenzial durch Metagenomik

dargestellt. Diese radikalischen Enzyme sind Schlüsselenzyme des anaeroben mikrobiellen Abbaus von Glycerin und 1,2-Propandiol<sup>[7]</sup>. Sie sind von großer ökonomischer Bedeutung, da die biotechnologische Produktion von 1,3-Propandiol von ihrer Aktivität abhängt. In dem kürzlich von den Firmen Genencor International und DuPont entwickelten Produktionsprozess wird 1,3-Propandiol nicht direkt aus dem Substrat Glycerin sondern mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli*-Stammes aus Glukose hergestellt, die dann über das Glykolyse-Intermediat Dihydroxyaceton-3-Phosphat mit Hilfe von 2 Enzymen aus *Saccharomyces cerevisiae* zunächst in Glycerin überführt wird<sup>[8]</sup> (s. Abb.). Anschließend erfolgt die Umwandlung in 1,3-Propandiol durch die Reaktionen der Glycerin-Dehydratase und 1,3-Propandiol-Dehydrogenase. Die Dehydratase-Reaktion ist der limitierende Schritt, da das Enzym während der Umsetzung von Glycerin stark inaktiviert wird<sup>[7]</sup>. Bei der Prozessentwicklung muss weiterhin Berücksichtigung finden, dass eine 1,3-Propandiol-Konzentration im Bereich von 2 M erreicht werden muss<sup>[8]</sup>. 1,3-Propandiol kann von Glycerin- und Diol-Dehydratase nicht umgesetzt werden, wirkt aber als Inhibitor, da es mit Glycerin um die Bindung am Enzym konkurriert<sup>[4]</sup>. Daher wird der Einsatz von Dehydratase angestrebt, die einer geringen Inaktivierung durch Glycerin bzw. einer geringen Hemmung durch 1,3-Propandiol unterliegen.

Zur Isolierung solcher Dehydratase wurden von uns Metagenombanken aus komplexen Anreicherungskulturen konstruiert und durchmustert [s. Abb.]. Vorherige Screeningprogramme belegten, dass die Verwendung von Defektmutanten, die nur nach heterologer Komplementation durch die

Zielgene zum Wachstum befähigt sind, vorteilhaft für ein auf Enzymaktivität basierendes Verfahren ist<sup>[6]</sup>. Hierfür wurde ein *E. coli*-Stamm konstruiert, der alle Gene für die anaerobe Glycerinverwertung aus *Citrobacter freundii* mit Ausnahme der Gene für die Glycerin-Dehydratase trägt<sup>[4]</sup>. Parallel dazu wurde eine Durchmusterung mit spezifischen Dehydratase-Genfragmenten als Sonden durchgeführt. Insgesamt wurden ca. 700.000 Klone überprüft, dabei 7 positive identifiziert und analysiert<sup>[4]</sup>. Nach Subklonierung und Kompletierung der Dehydratase-Genregionen sowie heterologer Synthese und Reinigung der Enzyme erfolgte eine biochemische Charakterisierung. Betrachtet man sowohl die Stabilität gegenüber der Inaktivierung durch Glycerin als auch die Unempfindlichkeit gegenüber der Hemmung der Aktivität in Gegenwart von 1,3-Propandiol sowie die katalytische Effizienz, wies eine der aus den Metagenombanken isolierten Diol-Dehydratase günstige Eigenschaften für einen Einsatz im Rahmen der biotechnischen 1,3-Propandiol-Produktion auf. Diese und ähnliche Untersuchungen belegen, dass die Verwendung von metagenomischen Verfahren in Kombination mit effizienten Durchmusterungstechnologien zur Isolierung von neuen robusten Biokatalysatoren mit hohem Anwendungspotential führt. Diese Vorgehensweise wird sich daher in den kommenden Jahren als eine Standardmethode für die Suche nach neuen industriell-relevanten Biokatalysatoren und Verbindungen etablieren.

#### Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Gottschalk für seine tatkräftige Unterstützung. Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, und der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die finanzielle Förderung.

#### Literatur

- [1] Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A., and Gottschalk, G. (1999): Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3901–3907
- [2] Henne, A., Schmitz, R. A., Bömeke, M., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2000): Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3113–3116.
- [3] Knietzsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., and Daniel, R. (2003): Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 46–56

[4] Knietzsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2003): Identification and characterization of genes encoding coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratases from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3048–3060

[5] Knietzsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., and Daniel, R. (2003): Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1408–1416.

[6] Majernik, A., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2001): Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na<sup>+</sup> (Li<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J. Bacteriol.*, 183, 6645–6653

[7] Seifert, C., Bowien, S., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2001): Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Eur. J. Biochem.*, 268, 2369–2378

[8] Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., and Sanford, K. (2000): The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta*, 1543, 434–455

#### Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. Rolf Daniel  
 Institut für Mikrobiologie und Genetik  
 Georg-August-Universität Göttingen  
 Grisebachstr. 8  
 D-37077 Göttingen  
 Tel.: 0551-393827  
 Fax: 0551-393793  
 rdaniel@gwdg.de



**Rolf Daniel**

Jahrgang 1963; 1984–1991 Biologiestudium an der Georg-August-Universität zu Göttingen, 1994 Promotion bei Prof. Dr. Gerhard Gottschalk am Institut für Mikrobiologie der Georg-August-Universität;

1994–1995 Postdoktorand bei Prof. Dr. Gerhard Gottschalk; 1995–1996 Forschungsstipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Labor von Prof. Dr. R. Schekman am Institut für Molekulare Zellbiologie/University of California, Berkeley; seit 1996 Arbeitsgruppenleiter am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität; 2003 Habilitation für das Fach Mikrobiologie