

VAAM-Promotionspreisträger 2004

Mikrobielle Synthese und biotechnologische Produktion von Polythioestern

Tina Lütke-Eversloh, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge

► Viele Mikroorganismen sind in der Lage, wasserunlösliche Polyester als Speicherstoffe in den Zellen zu akkumulieren. Bei diesen Einschlüssen handelt es sich um Polyhydroxyalkanoate (PHA), die thermoplastisch verformbar sind und als „Bioplastik“ verschiedenartige technische Anwendungen finden, beispielsweise als kompostierbares Verpackungsmaterial. Auf der Suche nach neuen interessanten Materialien wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine bisher unbekannte Klasse von Biopolymeren synthetisiert: Polythioester (PTE). Die einzigen bisher bekannten Biopolymere, die Schwefel enthalten, sind Proteine und einige komplexe Polysaccharide; sie enthalten Schwefel jedoch nur in den Seitenketten, nicht im Polymerrückgrat.

Basierend auf der Unspezifität der katalysierenden Enzyme wurde insbesondere das PHA-akkumulierende Bakterium *Ralstonia eutropha* für die Biosynthese von verschiedenen Copolymeren untersucht, die neben 3-Hydroxybutyrat (3HB) 3-Mercaptopropionat (3MP), 3-Mercaptovalerat (3MV) enthielten. Je nach Substrat und Kultivierungsbedingung, lag der PTE-Gehalt bei bis zu 30 Prozent des Zelltrockengewichts, und der Anteil des schwefelhaltigen Bausteins konnte bis zu 70 mol% betragen^[1-3].

Die Biosynthese von Poly(3HB) kann in *R. eutropha* nicht unterdrückt werden, da 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A (3HB-CoA) ausgehend von Acetyl-CoA synthetisiert wird und somit stets zur Produktion von 3HB-haltigen PTEs führte. So wurde ein neues Verfahren zur Produktion von Homopolythioestern entwickelt. Dazu wurde ein rekombinanter Stamm von *Escherichia coli* eingesetzt, der durch die Expression von drei Genen unterschiedlicher Herkunft zu einem „künstlichen“ PHA-Biosyntheseweg befähigt ist, der so nicht in der Natur vorkommt. Bei Zugabe der entsprechenden 3-Mercaptofettsäure wurde das Vorstufensubstrat in die Zelle aufgenommen, durch eine Butyratkinase (**Buk**) phosphoryliert und anschließend durch eine Phosphotransbutyrylase (**Ptb**) in den entsprechenden CoA-Thioester überführt, der dann durch die PHA-Synthase (**PhaEC**) polymerisiert wurde (Abb. 1). Elektronenmikroskopische

Untersuchungen von PTE-akkumulierenden Zellen zeigten zahlreiche diffuse PTE-Grana im Cytoplasma mit einer Größe von 0,03–0,1 µm (Abb. 1). Die chemische Zusammensetzung der gereinigten PTEs wurde durch verschiedene Analysen wie Gaschromatographie/Massenspektrometrie und NMR Spektroskopie verifiziert. Die Entwicklung dieses „BPEC“-Prozesses zur biotechnologischen Produktion von PTEs wurde auch erfolgreich im 30 Liter-Maßstab umgesetzt^[4].

Um Informationen über die physikalischen Eigenschaften dieses neuen Materials – und somit über potenzielle Anwendungen – zu erhalten, wurden in Kooperation mit kanadischen Polymerchemikern verschiedene PTEs, etwa mittels Differentialkalorimetrie oder Röntgenbeugungsanalyse untersucht. Dabei zeigten die PTEs signifikante Unterschiede zu den bereits bekannten PHAs, wie beispielsweise höhere Schmelztemperaturen und geringere Kristallinität^[5].

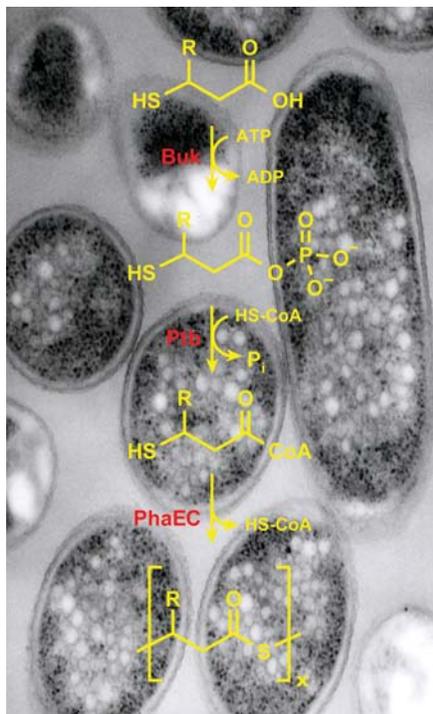


Abb. 1: Biosynthese von Polythioestern in rekombinanten Zellen von *Escherichia coli*.



Tina Lütke-Eversloh

(Jahrgang 1974) studierte Biologie an der

Universität Münster. Sie promovierte im Juli 2003 an der Universität Münster in der Arbeitsgruppe von Alexander Steinbüchel. Sie arbeitet jetzt als Postdoc bei Gregory Stephanopoulos am Massachusetts Institute of Technology in Cambridge, USA.

Literatur

- [1] Lütke-Eversloh, T., Bergander, K., Luftmann, H. & Steinbüchel, A. (2001). Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur containing polymer with thioester linkages. *Microbiology* 147, 11–19.
- [2] Lütke-Eversloh, T., Bergander, K., Luftmann, H. & Steinbüchel, A. (2001). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptobutyrate) as a sulfur analogue to poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). *Biomacromolecules* 2, 1061–1065.
- [3] Lütke-Eversloh, T. & Steinbüchel, A. (2003). Novel precursor substrates for polythioesters (PTE) and limits of PTE biosynthesis in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 191–196.
- [4] Lütke-Eversloh, T., Fischer, A., Remminghorst, U., Kawada, J., Marchessault, R. H., Bögershausen, A., Kalwei, M., Eckert, H., Reichelt, R., Liu, S.-J. & Steinbüchel, A. (2002). Biosynthesis of novel thermoplastic polythioesters by engineered *Escherichia coli*. *Nature Materials* 1, 236–240.
- [5] Lütke-Eversloh, T., Kawada, J., Marchessault, R. H. & Steinbüchel, A. (2002). Characterization of biological polythioesters: Physical properties of novel copolymers synthesized by *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules* 3, 159–166.

Korrespondenzadresse:

Tina Lütke-Eversloh
Massachusetts Institute of Technology
Department of Chemical Engineering
77 Massachusetts Avenue, 56–422
Cambridge, MA 02139 (USA)
Tel.: 001-617-258-0398
Fax: 001-617-253-3122
evexslo@uni-muenster.de