

Cellulosesynthese

Bakterielle Cellulose – ein Netzwerk gestaltet von drei Cellulosesynthasen

MARTIN BIMMER, WOLFGANG LIEBL, ARMIN EHRENREICH
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE, TU MÜNCHEN, FREISING

Besides plants also some bacterial genera are able to synthesize cellulose in remarkably high quantities. Bacterial cellulose from the acetic acid bacterium *Komagataeibacter hansenii* has a big advantage supporting its use as multifunctional and sustainable material – it is free of non-cellulosic components, unlike cellulose of plant origin. Based on marker-free in frame deletions, we propose a model where cellulose fibers released by the main cellulose synthase (BcsAB1) are modified by two additional cellulose synthases.

DOI: 10.1007/s12268-023-1908-9
© Die Autoren 2023

■ Cellulose ist das am häufigsten vorkommende natürliche Biopolymer auf unserem Planeten. Als Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände stellt sie rund 40 Prozent der weltweiten Gesamtbiomasse [1]. Was meist weniger bekannt ist: Auch einige Bakteriengattungen sind in der Lage, Cellulose in vergleichsweise großen Mengen herzustellen. Dabei greifen diese auf dieselbe Enzymatik zurück, wie es höhere Pflanzen tun [2]. Essigsäurebakterien, insbesondere Vertreter der Gattung *Komagataeibacter*, sind besonders prominente Produzenten bakterieller Cellulose (BC). Diese macht den Hauptbestandteil der Essigmutter aus, also jenes massiven Biofilms, der sich auf der Oberfläche von stehenden alkoholischen Getränken – wie Wein – bildet und in dem Essigsäurebakterien Alkohol in Gegenwart von Sauerstoff zu Essigsäure oxidieren.

Die Homologie des bakteriellen Cellulosesynthase(CS)-Komplexes zum pflanzlichen System macht die Cellulosesynthese in *Komagataeibacter* zu einem hervorragenden Modellsystem [3]. Als Modellorganismen haben sich hier zwei *K. hansenii*-Stämme etabliert, wobei sich der Stamm ATCC 53582 durch eine um ein Vielfaches höhere Produktionsmenge und -geschwindigkeit im Vergleich zum Stamm ATCC 23769 auszeichnet. Die hohe Reinheit von BC sowie deren hohe Biokompatibilität sind Gründe, warum es für BC vielfältige

biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten gibt.

Die genetische Grundlage für die Synthese von BC besteht in den erwähnten Stämmen aus drei Gruppen von benachbarten Genen, die jeweils mindestens eine CS (*bcsAB*) und ein Kanalprotein (*bcsC*) codieren und jeweils wahrscheinlich Operons sind (**Abb. 1B**). Diese unterscheiden sich durch die Anzahl an zusätzlich codierten akzessorischen Proteinen [4].

Ein von unserer Arbeitsgruppe etabliertes Deletionssystem, das auf der Gegenselektion durch eine Cytosin-Desaminase in Anwesenheit von 5-Fluorocytosin beruht, wurde zur Konstruktion der Mutanten genutzt [5]. Dies erlaubte es erstmals, chromosomale markerfreie *in-frame*-Deletionen in Celluloseproduzierenden Essigsäurebakterien zu konstruieren [6]. Anhand der Phänotypen der erzeugten Einzel- und Doppelmutanten konnten wir damit beginnen, die spezifische physiologische Rolle jeder einzelnen der drei CS zu bestimmen, deren Gene in den drei putativen Operons unterschiedlicher Komplexität liegen [7].

Phänotypische Unterschiede von *K. hansenii* ATCC 23769 und ATCC 53582

Die Charakterisierung der Celluloseproduktion wurde in unbewegten, statischen Kulturen auf Komplexmedium mit Glucose durch-

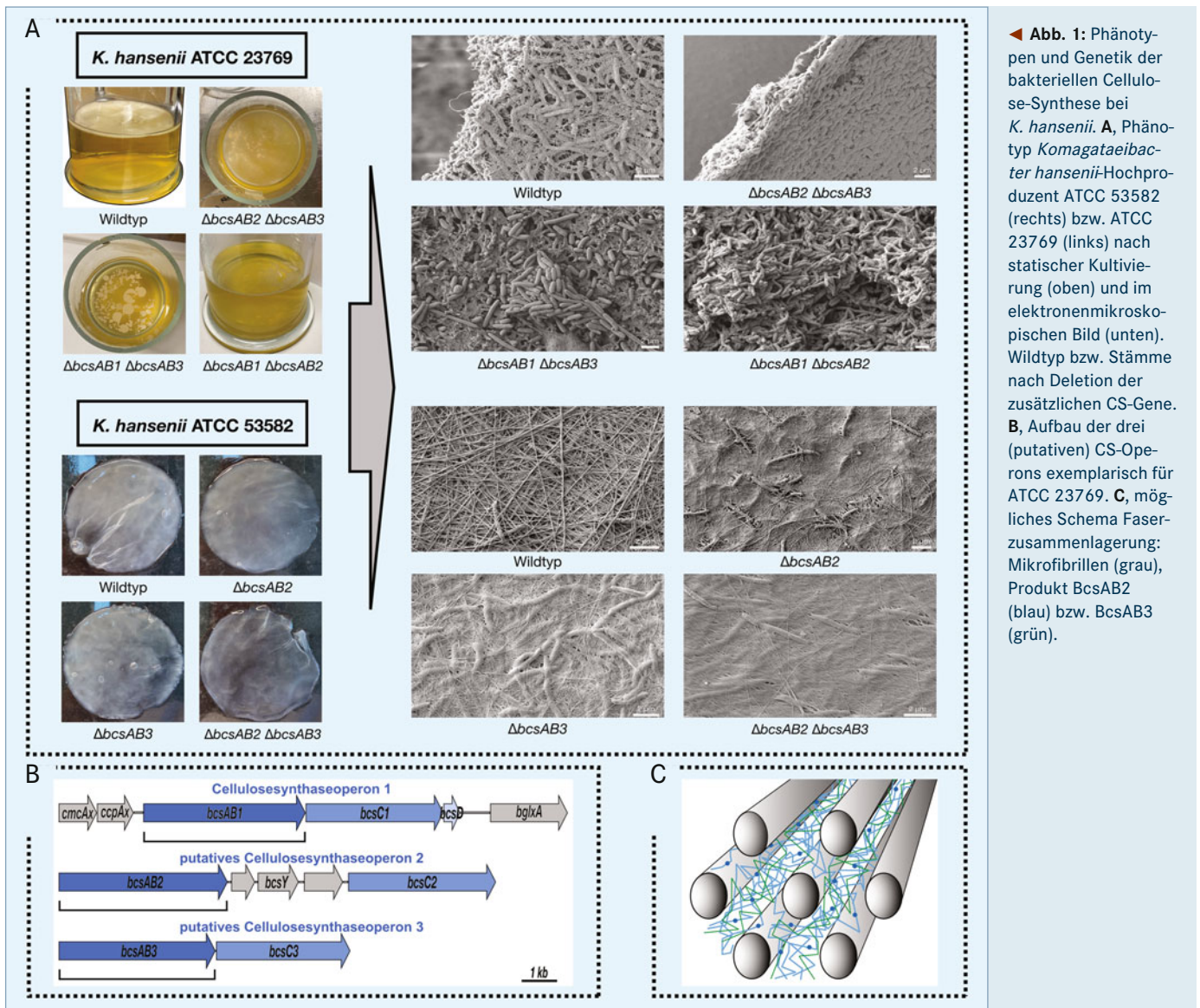
geführt. Obwohl beide *K. hansenii*-Stämme sich in der Struktur der drei CS-Operons ähneln, unterscheiden sie sich deutlich in der Menge und Geschwindigkeit der Celluloseproduktion. Während der Stamm *K. hansenii* ATCC 23769 für 21 Tage inkubiert wurde, bis sich ein massiver Biofilm bildete, reichten für den Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582 bereits sechs Tage aus.

Beitrag der einzelnen Cellulosesynthasen

Die konstruierten markerfreien *in-frame*-Deletionsstämme, die jeweils nur eine der drei CS bildeten (*BcsAB1*, *BcsAB2* oder *BcsAB3*), verdeutlichten die bereits in den Wildtypen beobachteten phänotypischen Unterschiede (**Abb. 1A**). Beiden *K. hansenii*-Stämmen ist gemein, dass die Bildung der Haupt-CS *BcsAB1* hinreichend und notwendig ist, um einen geschlossenen, festen und stabilen Biofilm zu bilden, der die gesamte Oberfläche des Kulturmediums bedeckt. Der Hochproduzent ATCC 53582 überragt auch bei alleiniger Expression der Haupt-CS den anderen Stamm ATCC 23769 deutlich. Unterschiedliche Beobachtungen wurden jedoch für die Einzelexpressionstämme der zusätzlichen CS gemacht. Im Stamm ATCC 23769 wurde bei alleiniger Expression von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* jeweils ein fragmentiertes, dünnes Pellikel gebildet. Dagegen war bei Expression nur von *bcsAB2* oder *bcsAB3* im Hochproduzenten, ATCC 53582, an der Oberfläche der Kultur gar kein freigesetztes extracelluläres Polymer zu erkennen.

Effekte der drei Cellulosesynthasen auf die räumliche Struktur des Netzwerks

Der mikrostrukturelle Aufbau des Cellulosenetzwerks wurde im Rasterelektronenmikroskop aufgeklärt. Die Aufnahmen beider *K. hansenii*-Stämme zeigten die typische Struktur von BC (**Abb. 1A**): Ein stark quervernetztes Netzwerk aus Cellulosefasern. *K. hansenii* ATCC 23769 synthetisiert insgesamt eine geringere Menge Cellulose, aber,



wie wir aus den Doppel-Deletionsstämmen wussten, bilden die zusätzlichen CS BcsAB2 und BcsAB3 hier mehr Polymer als im Hochproduzenten. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten neben den von BcsAB1 gebildeten Cellulosemikrofibrillen weitere extrazelluläre polymere Substanzen (EPS). Diese zusätzlichen EPS ließen sich anhand der Deletionsmutanten jeweils der Expression von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* zuordnen. Bei diesen Substanzen handelt es sich nach dem elektronenmikroskopischen Bild um scheinbar amorphe und bisher noch nicht näher charakterisierte Formen der Cellulose. Die von BcsAB2 gebildete Form findet sich dabei insbesondere in den Zwischenräumen des Fasernetzwerks. Die von BcsAB3 gebildete Substanz wird in nochmals deutlich geringerer Menge gebildet und umschließt die Einzelzellen. Deutlich anders verhielt es

sich für den Hoch-Cellulose-Produktionsstamm *K. hansenii* ATCC 53582: In der elektronenmikroskopischen Aufnahme waren lediglich die verknüpften Cellulosefasern zu erkennen. Jedoch nahm sowohl deren Abstand zueinander als auch die Dicke nach einer markerfreien *in-frame*-Deletion von *bcsAB2* bzw. *bcsAB3* signifikant ab. Ein separates Polymer, das der Expression dieser Gene zugerechnet werden könnte, konnte dagegen nicht erkannt werden.

Zur Unterscheidung dieser neu beschriebenen, scheinbar amorphen Formen der Cellulose wurde die Bezeichnung nicht-fibrilläres EPS (nfEPS) gewählt [6]. Eine zufällige Beobachtung zeigte während der Etablierung eines Präparationsprotokolls für die Elektronenmikroskopie, dass sich beide nfEPS bei Dehydratisierung durch Aceton lösten. Dagegen blieben sie bei einer Dehydratisierung

mit Ethanol erhalten. Eine benachbart zum *bcsAB2*-Lokus codierte putative Acetyltransferase (*bcsY*) legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem diesem putativen Operon zuzuordnenden Polymer um natürlich vorkommende Cellulose mit einem geringen Acetylierungsgrad handeln könnte. Jedoch war bislang ein Nachweis entsprechender Acetylgruppen nicht möglich. Unsere Arbeitshypothese ist, dass diese die Zellen einbettenden nfEPS u. a. die einzelnen Zellen in der Essigmutter vor Austrocknen schützen könnten.

Schema des Cellulosenetzwerks

Um zu einem umfassenderen Bild des Cellulosenetzwerks in *K. hansenii* zu kommen, wurden die Ergebnisse von physiochemischen Messungen, Transkriptions- und Proteomdaten sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten

Reporterstämmen mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zusammengeführt [6, 8].

Zusammen genommen führten diese Beobachtungen zu folgender Arbeitshypothese: Einzig die Haupt-CS BcsAB1 bildet große Mengen an fibrillärer, vorwiegend kristalliner Cellulose. Die durch die zusätzlichen CS BcsAB2 und BcsAB3 gebildeten nfEPS machen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Cellulosebiofilms des Hoch-Cellulose-Produktionsstamms ATCC 53582 nicht als zusätzlich sichtbares EPS bemerkbar, sie werden offenbar von den Cellulosefasern gleichsam vollständig „aufgesogen“. Somit ist kein Material mehr übrig, um die einzelnen Zellen einzuhüllen, wie oben für den Stamm ATCC 23769 beschrieben.

Hieraus entwickelten wir das in der Übersicht gezeigte Modell des BC-Fasernetzwerks (**Abb. 1C**). Dabei käme den nfEPS eine Funktion bei der Vernetzung der Cellulosefibrillen zu, um wie eine Art Klebstoff die Fasern zusammenzuhalten, ähnlich wie das bei pflanzlichen Cellulosefasern für die Hemicellulosen beschrieben ist [9].

Bisher sind diese Ergebnisse nur für die Grundlagenforschung interessant, um die BC-Synthese besser zu verstehen. Aber angesichts des stetig wachsenden Bedarfs an nachhaltigen, ressourcenschonenden und kreislauffähigen Materialien können diese Erkenntnisse vielleicht einmal dazu verwendet werden, neue, angepasste BC mit für bestimmte Anwendungen verbesserten Eigenschaften biotechnologisch zu synthetisieren. Dies könnte einen Beitrag dazu leis-

ten, erdölbasierte Materialien zu ersetzen und die Umsetzung der Nachhaltigkeitsziele zu beschleunigen.

Danksagung

Wir bedanken uns herzlich bei A. Klingl (LMU München) mit seinem Team für die Rasterelektronenmikroskopie, C. Ludwig (BayBioMs, TU München) für die Proteomik-Messungen und C. Zollfrank sowie M. Reimer (TUM Campus Straubing) für physikochemische Messungen. Ein Dank geht auch an alle Studierenden, die die Arbeiten unterstützt haben. ■

Literatur

- [1] Bar-On YM, Phillips R, Milo R (2018) The biomass distribution on Earth. *Proc Nat Acad Sci USA* 115: 6506–6511
- [2] Saxena IM, Brown RM (1997) Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: sequence analysis of processive β -glycosyltransferases with the common motif 'D, D, D35Q(R,Q)XRW'. *Cellulose* 4: 33–49
- [3] Brown RM Jr. (2004) Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J Polymer Sci Part A: Polymer Chem* 42: 487–495
- [4] Römling U, Galperin MY (2015) Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* 23: 545–557
- [5] Kostner D, Peters B, Mientus M et al. (2013) Importance of codB for new codA-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 8341–8349
- [6] Bimmer M, Mientus M, Klingl A et al. (2022) The Roles of the Various Cellulose Biosynthesis Operons in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. *Appl Environ Microbiol* 88: 88: e0246021
- [7] Koizumi S, Tomita Y, Kondo T, Hashimoto T (2009) What Factors Determine Hierarchical Structure of Microbial Cellulose – Interplay among Physics, Chemistry and Biology. *Macromol Symp* 279: 110–118
- [8] Bimmer M et al. (2023) Genetic and Proteomic Analysis of Cellulose Synthesis in the High-Producing Strain *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. *Appl. Microbiol Biotechnol*, accepted
- [9] Atalla RH, Hackney JM, Thompson NS (1993) Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int J Biol Macromol* 15: 109–112

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Martin Bimmer (links) und Wolfgang Liebl



Armin Ehrenreich

Korrespondenzadresse:

Dr. Armin Ehrenreich
Lehrstuhl für Mikrobiologie
TU München
Emil-Ramann-Straße 4
D-85354 Freising
aehren@tum.de
www1.ls.tum.de/mbio/startseite