

# Abschlussbericht

AZ 33741

## **Lichtgetriebene Ganzzell-Biotransformationen in lebenden Zellen zur nachhaltigen Synthese wertvoller Chemikalien**

*Kurztitel*

## **Lichtgetriebene Ganzzell-Biotransformationen**

Antragsteller:

**Prof. Dr. Robert Kourist**

**Technische Universität Graz  
(TUG)**

Institut für Molekulare Biotechnologie  
Petersgasse 140  
A-8010 Graz, Graz, Österreich  
Tel. +43 316873 4071  
kourist@tugraz.at

**Dr. Dan Enke**

**Cyano  
(CYA)**

Magnusstr. 11  
12489 Berlin  
Tel.: 030-63924481  
dan.enke@cyano-  
biotech.com

**Dr. Ralf Zuhse**

**Chiracon GmbH  
(CHI)**

Biotechnologiepark  
14943 Luckenwalde  
Tel. 03371 681299  
zuhse@chiracon.de

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	4
2. Zielsetzung .....	5
2.1. Zielsetzungen aus dem Antrag .....	5
2.2. Änderungen gegenüber dem Antrag .....	5
3. Einleitung .....	6
3.1. Prinzip lichtgetriebener Biotransformationen .....	6
3.2. Regulatorische Elemente zur Genexpression in <i>Synechocystis</i> .....	7
3.2.1. Einbringen einer heterologen Expressionskassette .....	7
3.2.2. Native Promotoren aus <i>Synechocystis</i> .....	8
3.2.3. Shuttle-Vektor für <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 .....	9
3.3. Gewählte Modellenzyme und -reaktionen .....	9
3.3.1. YqjM aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	9
3.3.2. Iminreduktasen .....	10
3.3.3. CHMO aus <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIMB 9871 .....	10
3.4. Kaskadenreaktion zur Unterdrückung der Nebenreaktion .....	11
3.4.1. Konzept der Kaskadenreaktion .....	11
3.4.2. Koexpression von YqjM und CHMO .....	13
3.5. Limitierungen von licht-getriebenen Biotransformationen .....	13
3.5.1. Toxizität und Transport .....	13
3.5.2. Selbstschattierung .....	14
3.5.3. Konkurrierende Elektronensenken .....	14
4. Ergebnisse und Diskussion .....	15
4.1. Synthese der Ausgangsverbindungen und Etablierung der Analytik .....	15
4.1.1. Zusammenfassung .....	15
4.1.2. Synthesen Chiracon .....	15
4.1.3. Chirale Analytik .....	15
4.2. Molekularbiologische Optimierung von En-Reduktion und Oxyfunktionalisierung... 17	
4.2.1. Zusammenfassung .....	17
4.2.2. Iminereduktion .....	18
4.2.3. Molekularbiologische Optimierung der En-Reduktion .....	18
4.2.4. Verwendung verschiedener Promotoren vor CHMO .....	19
4.3. Kultivierungsoptimierung von En-reduktion und Oxyfunktionalisierung .....	22
4.3.1. Zusammenfassung .....	22
4.3.2. Einfluss der Kultivierung auf die Oxyfunktionalisierung .....	23
4.3.3. Einfluss der Kultivierung auf die En-Reduktion .....	25
4.3.4. Analyse des 150 mL Ansatzes .....	25
4.3.5. Ausblick: Upscaling mit dem Bubble Column Reactor (BCR) .....	26
4.3.6. Umweltbetrachtung .....	27
4.4. Eine Kaskade zur Unterdrückung einer Nebenreaktion in <i>Synechocystis</i> .....	29

4.4.1.	Zusammenfassung .....	29
4.4.2.	Reproduktionsprobleme der Kaskade .....	30
4.4.3.	Koexpression von CHMO und YqjM.....	32
5.	Publikationsplan.....	34
6.	Meilensteine.....	34
7.	Referenzen .....	35

## 1. Zusammenfassung

Das Prinzip der lichtgetriebenen Biotransformation nutzt phototrophe Organismen wie das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die Katalyse von Feinchemikalien. Das Gen einer Oxidoreduktase wird in das Cyanobakterium eingebracht und heterolog exprimiert. Der für die Reaktion benötigte Cofaktor NADPH wird über oxygene Photosynthese recycelt – eine Strategie, die sowohl in ihrer Effizienz als auch ihrer Atomökonomie überzeugt. Oxyfunktionalisierungen profitieren zusätzlich von der intrazellulären Sauerstoffproduktion durch die am Photosystem II ablaufende Wasserspaltung.

Innerhalb dieses Projektes wurde der Ansatz anhand verschiedener Modelreaktionen an der TU Graz und mit Hilfe der KMU-Partner Cyano Biotech und Chiracon untersucht. Besonderer Fokus wurde auf die molekularbiologische Optimierung der Enzymproduktion gelegt und eine Steigerung der intrazellulären Enzymkonzentration konnte durch die Verwendung eines stärkeren Promoters in allen Fällen erreicht werden.

Das Beispiel der lichtgetriebenen Iminreduktion verdeutlichte die breite Anwendbarkeit des Konzepts auf verschiedene Oxidoreduktasen. Hier erwies sich besonders der Austausch des Promoters als entscheidender Schritt zur Aktivitätssteigerung.<sup>[1]</sup>

In Kulturen mit erhöhter Zelldichte schirmen sich die Zellen gegenseitig ab. Die dadurch resultierende Selbstschattierung reduziert die Lichtverfügbarkeit und dadurch die Effizienz der Photosynthese. So wurde im Fall der optimierten En-Reduktion die NADPH-Verfügbarkeit als limitierender Faktor bei moderaten Zelldichten identifiziert und machte eine Optimierung des photosynthetischen Elektronentransfers notwendig. Durch das gezielte Ausschalten einer konkurrierenden Elektronensenke („electron funneling“) konnte die Zellproduktivität für die En-Reduktion verdoppelt werden.<sup>[2]</sup> In einem Substrate-Feeding-Experiment setzte der rekombinante Knock-out Stamm 60 mM Substrat in 4 h um.<sup>[2]</sup> Die Ergebnisse präsentieren einen entscheidenden Schritt lichtgetriebener Ganzzellbiotransformationen in Richtung industrieller Anwendbarkeit. Erste Upscaling-Versuche der Reaktion resultierten in einer Reduzierung der Raum-Zeit-Ausbeute und die Optimierung konnte im Rahmen des Projektes nicht abgeschlossen werden, wird aber weiterverfolgt.

Der optimierte Stamm für die Oxyfunktionalisierung wies eine geringe genetische Stabilität auf und verlor in wenigen Wochen seine Aktivität. Gründe dafür konnten im Rahmen des Projekts nichts vollständig in Erfahrung gebracht werden. Aus diesem Grund konnte auch die geplante Kaskade zur Minimierung der Ketoreduktion bisher nicht abgeschlossen werden. Der Ansatz wird unter Verwendung anderer Baeyer-Villiger-Monooxygenasen weitergeführt.

## 2. Zielsetzung

### 2.1. Zielsetzungen aus dem Antrag

Entspricht im Antrag Abschnitt 1.4 (Antrag, S. 9)

- (1) Optimierung der Ene-Reduktion über Photobiotransformationen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und Erhöhung der Produktkonzentration auf 50 mM über gentechnische Methoden und Kultivierungsstrategien.
- (2) Untersuchung von *Synechococcus* sp. PCC 7002 als alternatives Produktionssystem
- (3) Entwicklung einer Methode zur Produktaufarbeitung und –Aufreinigung (CHI)
- (4) Entwicklung eines Stammes zur Oxyfunktionalisierung von Terpenen (TUG)

### 2.2. Änderungen gegenüber dem Antrag

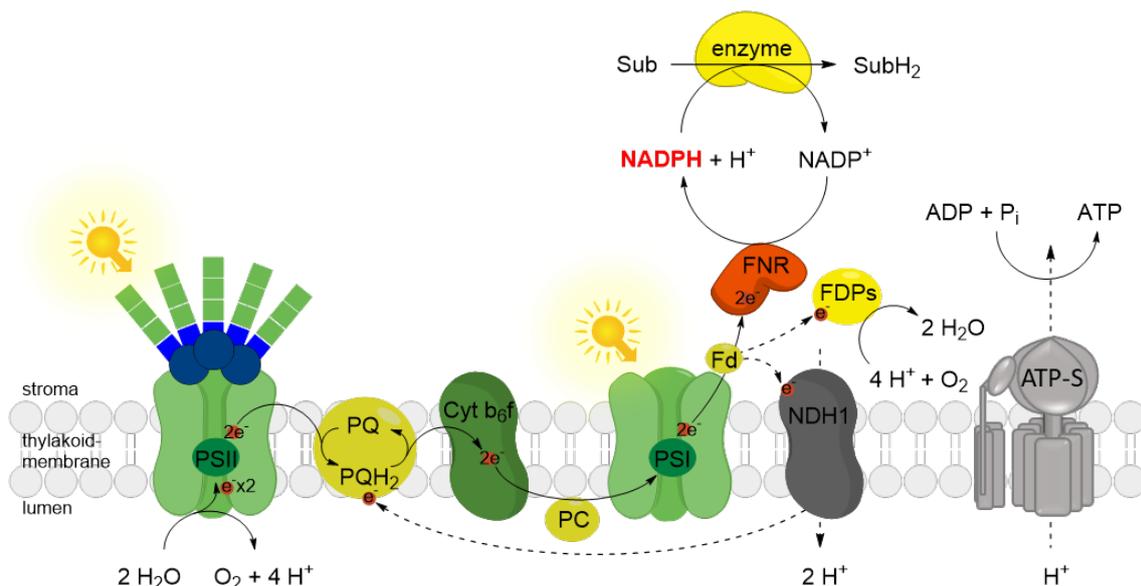
- (1) Aufgrund einer aktuellen Publikation über eine P450 Monooxygenase in *Synechocystis*<sup>[3]</sup> wurde der Fokus von P450 Monooxygenases auf eine Baeyer-Villiger Monooxygenase verschoben
- (2) Wie in der Risikobetrachtung im Antrag (Abschnitt 6.1, S. 19) aufgeführt, wurde ein stärkerer Fokus auf die Oxyfunktionalisierung in *Synechocystis* katalysiert durch eine Baeyer-Villiger Monooxygenase gelegt
- (3) Da nun mehrere Beispiele für erfolgreiche Photobiotransformationen mit Einzelenzymen vorliegen, wurde die Kopplung verschiedener Enzyme zu artifiziellen Mini-Pfadwegen zur Demonstration des synthetischen Nutzens des Produktionssystems anvisiert
- (4) Iminreduktasen wurden den Modellenzymen für die Untersuchung licht-getriebener Biorreduktionen hinzugefügt. Ziel war hier, die Attraktivität des Licht-getriebenen Reaktionssystems mit der Synthese optisch reiner sekundärer Amine zu demonstrieren.
- (5) Da Zwischenergebnisse im Verlauf des Projektes zeigten, dass die Licht-getriebene Ene-Reduktion mit YqjM durch NADPH limitiert ist, wurde einer Anregung des Gutachters des Antrages folgend, der Fokus der Arbeiten auf ein sogenanntes electron-funneling, d.h. eine Umleitung des Energiestoffwechsels in Richtung NADPH Regenerierung gelegt. Bei der Begutachtung des Antrages schlug ein Gutachter vor, die spezifische Aktivität über das Ausschalten alternativer Elektronensenken, konkret die sogenannten Flavodiironproteine (FDP) zu steigern. Dieser Ansatz wurde für das „electron funneling“ verfolgt. Während der Ansatz im Prinzip funktioniert, zeigte sich, dass der Effekt stark von den Bedingungen von Kultivierung und Biotransformation abhängt. Um den Effekt des Ausschaltens einer Elektronensenke sauber zeigen zu können, wurden die Experimente beim Partner TUG in der 2. Projektphase auf diesen Ansatz fokussiert.
- (6) Umverteilung der Arbeit: Chiracon hat mehr Substrate und Produktstandards synthetisiert, dafür kümmert sich Graz um die Aufarbeitung des 150 mL Ansatzes.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Prinzip lichtgetriebener Biotransformationen

Oxidoreduktasen katalysieren selektiv Redoxreaktionen unter milden Reaktionsbedingungen und spielen daher eine wichtige Rolle für die Herstellung von Feinchemikalien und Pharmastoffen. Für ihre Aktivität benötigen Oxidoreduktasen externe Cofaktoren wie NADH oder NADPH in stöchiometrischen Mengen. Da der Preis dieser Reaktionsäquivalente den Produktpreis bei weitem übersteigt, ist eine großtechnische Anwendung von Oxidoreduktasen ohne ein Recyclingsystem jedoch nicht wirtschaftlich. Gut etablierte Prozesse verwenden organische Cosubstrate wie Isopropanol oder Glukose für die Cofaktorregeneration, haben aber den Nachteil, dass nur wenige der verfügbaren Elektronenpaare des Donormoleküls genutzt werden. Dies führt nicht nur zu unerwünschten Nebenprodukten sondern auch zu einer erheblichen Senkung der Atomökonomie - einem zentralen Prinzip auf dem Weg zu umweltfreundlicheren Prozessen.<sup>[4]</sup>

Oxygene Photosynthese ermöglicht die lichtgetriebene Fixierung von Kohlenstoffdioxid mit Wasser als Elektronendonator und Sauerstoff als Nebenprodukt. Dieser hochoptimierte Prozess war einst der Grund dafür, dass sich Sauerstoff in der Atmosphäre anreichern konnte und so das Leben, wie wir es kennen, ermöglicht hat. Cyanobakterien waren die ersten Lebewesen, die oxygene Photosynthese betreiben konnten und im Zuge der Endosymbiontentheorie als Vorläufer der Chloroplasten in Algen und Pflanzen gelten. Die Verwendung von Licht und Wasser zur Bildung von Sauerstoff und Fixierung von Kohlenstoffdioxid allein macht phototrophe Organismen zu vielversprechenden Produktionssystemen in Zeiten des Klimawandels. Für lichtgetriebene Biotransformationen ist aber besonders die Regeneration der Reaktionsäquivalente NADPH und reduziertem Ferredoxins sowie die intrazelluläre Produktion von Sauerstoff von Bedeutung.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Photosynthesemaschinerie in der Thylakoidmembran von phototrophen Organismen. (adapted from Schmermund et al.<sup>[6]</sup>) PSII = Photosystem II, PQ = Plastochinon, PQH<sub>2</sub> = Plastochinol, Cyt b<sub>6</sub>f = Cytochrom-b<sub>6</sub>f-Komplex, PC = Plastocyanin, PSI = Photosystem I, Fd = Ferredoxin, FNR = Ferredoxin NADP+ Reduktase, FDPs = Flavodiiron Proteine, NDH1 = NADH Dehydrogenase ähnlicher Komplex 1, ATP-S = ATP-Synthase, Sub = Substrate, SubH<sub>2</sub> = reduziertes Substrate

Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Thylakoidmembran mit den wichtigsten Membranproteinkomplexen der Photosynthesemaschinerie. Die lichtgetriebene Wasser-oxidation wird durch das einzigartige  $Mn_4CaO_5$  Cluster am Photosystem II (PSII) katalysiert. Von dort werden die Elektronen aus der Wasserspaltung über den Plastochinonpool (PQ,  $PQH_2$ ), den Cytochrom- $b_6f$ -Komplex (Cyt  $b_6f$ ) und Plastocyanin (PC) auf das Photosystem I übertragen. Lichtenergie induziert hier, dass die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gebracht werden und Ferredoxin (Fd) reduziert wird. Ferredoxin stellt ein wichtiges Protein für den Elektronentransport im Metabolismus dar und liefert auch die Elektronen für die  $NADP^+$ -Reduktion durch die Ferredoxin-NADPH Reduktase (FNR). Durch diese Vorgänge an der Thylakoidmembran sind phototrophe Organismen in der Lage, einen großen Umsatz bei der Regeneration reduzierter Reduktionsäquivalente zu erzielen, der bereits bei verhältnismäßig geringen Lichtintensitäten den Bedarf des eigenen Metabolismus übersteigt (Lichtsättigung der Photosynthese).

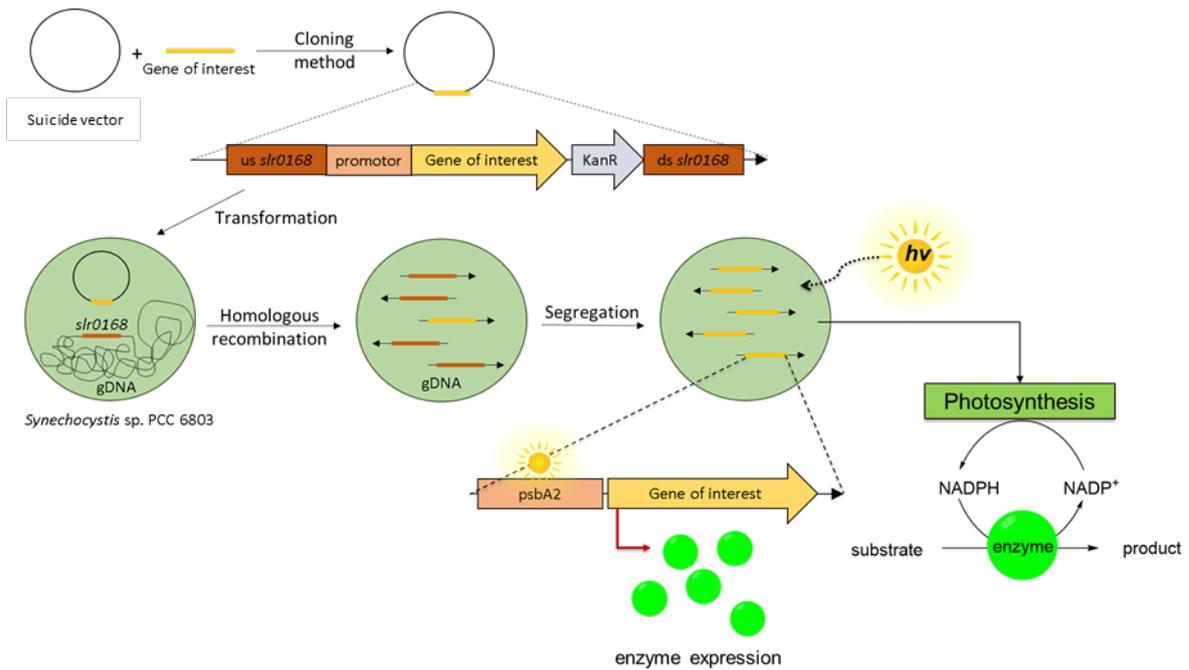
Wir wollen dieses Potential ausnutzen und neue Redoxreaktionen in die Zellen einbringen. Dafür werden die Gene von interessanten Oxidoreduktasen in das Genom des Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) integriert und der benötigte Cofaktor NADPH über Photosynthese regeneriert. Oxyfunktionalisierungen profitieren außerdem von der intrazellulären Bildung von Sauerstoff.

## **3.2. Regulatorische Elemente zur Genexpression in *Synechocystis***

### **3.2.1. Einbringen einer heterologen Expressionskassette**

Zwei Methoden zur genetischen Manipulation von *Synechocystis* können unterschieden werden: die Integration der Expressionskassette in das Genom<sup>[1,2,6,7]</sup> und die Verwendung von selbst-replizierbaren Plasmiden.<sup>[8-11]</sup>

Die Integration erfolgt über homologe Rekombination in einen Genomloкус wie *slr0168*,<sup>[1,2,6,7]</sup> der für das Überleben der Zellen nicht relevant ist und erfordert einen sogenannten Suizidvektor (Abbildung 2). Der Vektor enthält alle Elemente, die für eine erfolgreiche Klonierung in *Escherichia coli* erforderlich sind (Replikationsursprung, Resistenzgene). Die Multiple Cloning Site (MCS) wird von zwei Sequenzen flankiert, die als upstream (us) und downstream (ds)-Sequenz bezeichnet werden und homolog zu den flankierenden Genabschnitten des Integrationsloкус sind. Zwischen us- und ds-Sequenz liegt die Expressionskassette, die einen Promotor, das rekombinante Gen und einen Selektionsmarker mit eigenem Promotor enthält. *Synechocystis* ist von Natur aus dazu befähigt, Fremd-DNA aufzunehmen. Nach einer erfolgreichen Transformation wird die Expressionskassette in den gewählten Genloкус integriert und der Rest des Suizidvektors von der Zelle verdaut. Da *Synechocystis* polyploid ist, folgt die Segregation, in dem die Expressionskassette in jede Genomkopie integriert wird. Dieser Schritt kann bis zu acht Wochen in Anspruch nehmen und stellt die Hauptlimitierung dieser Methode dar.



**Abbildung 2** Konzeptionelles Schema zu lichtgetriebenen Reaktionen in genetisch-manipulierten *Synechocystis* Zellen. Die Expressionskassette für ein rekombinantes Gen wird über homologe Rekombination in alle Genomkopien des Wirts integriert. Die Genexpression durch einen lichtabhängigen Promoter wie  $P_{psbA2}$  reguliert. Die Regeneration des Cofaktor NADPH, der für die Enzymkatalyse in stöchiometrischen Mengen benötigt wird, erfolgt über Photosynthese

Durch die Verwendung von selbst-replizierbaren Plasmiden, könnte der zeitaufwendige Schritt der Segregation umgangen werden. Diese Art von Vektoren beziehen alle Elemente, die für eine unabhängige Replikation im Wirtstamm notwendig sind.

### 3.2.2. Native Promotoren aus *Synechocystis*

Produktionsstämme wie *E. coli* werden seit mehreren Jahrzehnten intensiv untersucht und genetisch manipuliert. Dies führte zu der umfangreichen Toolbox an regulierenden Elementen für rekombinante Proteinproduktion. Viele dieser Elemente funktionieren nicht oder nur wenig in *Synechocystis*.<sup>[12]</sup> Daher ist die Charakterisierung neuer Regulatoren wie Promotoren notwendig. In diesem Projekt sind vier Promotoren von Interesse:  $P_{psbA2}$ ,  $P_{cpc}$ ,  $P_{zia}$  und  $P_{T5}$ . Der *psbA2*-Promoter wurde bereits in den vorherigen Arbeiten verwendet<sup>[6,7]</sup> und kontrolliert in *Synechocystis* die Expression der D1 Untereinheit des PSII.<sup>[13]</sup> Der *cpc*-Promotor gilt als bisher stärkster Promotor<sup>[14,15]</sup> und ist in *Synechocystis* dem *cpc*-Operon vorgeschaltet. Dies kodiert für die Untereinheiten der Phycobilisomen.<sup>[16]</sup> Sowohl  $P_{psbA2}$  als auch  $P_{cpc}$  sind lichtabhängig.

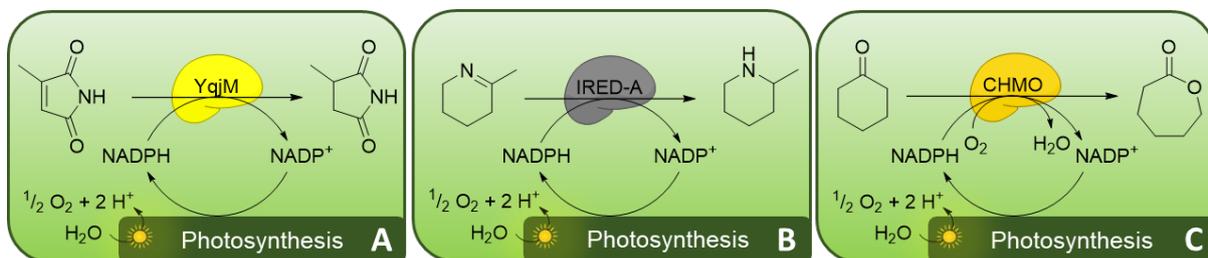
Für die Herstellung rekombinanter Enzyme ist eine regulierte Genexpression von Vorteil. Aus diesem Grund wurde  $P_{zia}$  als dritter, natürlicher Promoter herangezogen.  $P_{zia}$  wird durch den Repressor *ziaR* in Abwesenheit von  $Zn^{2+}$  blockiert und steuert die Expression der Zink-transportierenden P-Typ ATPase *ZiaA*, die vermutlich eine Rolle in der Zink-Toleranz von *Synechocystis* spielt.<sup>[17,18]</sup> Der letzte Promoter, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wird, ist der Phagen-Promoter T5. Er stammt als einziger Promoter nicht aus *Synechocystis* und ist konstitutiv.

### 3.2.3. Shuttle-Vektor für *Synechococcus* sp. PCC 7002

Da dieses *Synechococcus* sp. PCC 7002 (*Synechococcus*) schneller wächst und als robuster gilt, wurde das Cyanobakterium als alternativer Wirt für lichtgetriebene Biokatalyse in Betracht gezogen. *Synechococcus* enthält außerdem mehrere endogene Plasmide, die in höherer Kopiezahl als das Genom vorliegen und sich daher für die Integration einer Expressionskassette eignen.<sup>[19]</sup> Der kleinste Plasmid pAQ1 liegt im Verhältnis 50:6 zum Chromosom vor und hat eine Größe von 4809 bp. Er ist für das Überleben der Zelle essentiell und bietet sich für die genetische Manipulation an.<sup>[19]</sup> Da bisher kein Vektor für *Synechococcus* an der TU Graz vorlag, wurde zunächst das Design des Vektors nach Xu *et al.* geplant.

### 3.3. Gewählte Modellenzyme und -reaktionen

In diesem Projekt wurden zwei Arten von licht-getriebenen Biotransformationen anhand von drei Modellenzymen näher untersucht (Abbildung 3). Reduktive Biotransformationen bezeichnen die Reduktion von Verbindungen wie Enonen oder Iminen unter Oxidation von NADPH. Diese Art von Reaktionen nutzt das Cofaktorrecycling über Photosynthese und wurde in diesem Projekt anhand von einer Ene-Reduktase und drei Imin-Reduktasen untersucht.<sup>[1,2,6]</sup> Oxyfunktionalisierungen involvieren zusätzlich molekularen Sauerstoff als Reaktionskomponente. Mindestens ein Sauerstoffatom wird dabei in das Produkt integriert, wie die Beispielreaktion in Abbildung 3C zeigt. Die intrazelluläre Bildung von molekularer Sauerstoff bei der Wasserspaltung am PSII stellt einen weiteren Vorteil phototropher Produktionssystem dar.<sup>[8]</sup> Die geringe Löslichkeit von Sauerstoff in wässriger Phase und die daraus resultierende niedrige Sauerstofftransferate zwischen Gasraum und Flüssigkeit stellt ein Hauptproblem von Sauerstoff-abhängigen Prozessen dar.<sup>[8]</sup> In aeroben, heterotrophen Produktionswirten konkurrieren Oxyfunktionalisierungen zudem mit der Zellatmung.<sup>[8,20]</sup> Anhand des Alkan-Hydroxylase-Systems AlkBGT from *Pseudomonas putida* GPo1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Monooxygenase-katalysierte Reaktion photosynthetisch produzierten Sauerstoff verwendet.<sup>[8,10]</sup> Im Folgenden werden die ausgewählten Modellenzyme näher vorgestellt.

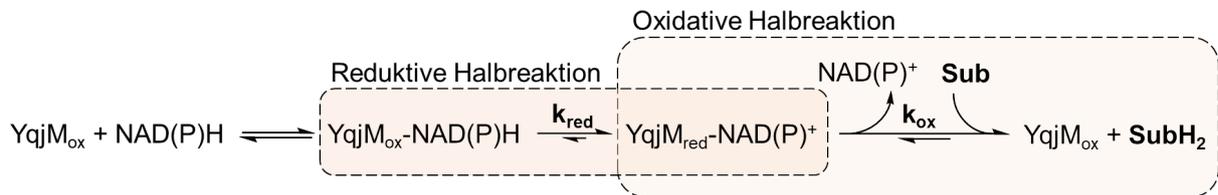


**Abbildung 3** Modellreaktionen in rekombinanten *Synechocystis*. A) Die NADPH-abhängige Ene-Reduktase YqjM aus *Bacillus subtilis* katalysiert die Reduktion von C=C-Doppelbindungen in Verbindungen wie 2-Methylmaleimid. B) Imin-Reduktasen wie die IRED-A aus *Streptomyces* sp. GF3587 können Imine wie 6-Methyltetrahydropyridine reduzieren. C) Die NADPH-abhängige Oxyfunktionalisierung von Cyclohexanon zu  $\epsilon$ -Caprolactone involviert molekularen Sauerstoff und wird durch Baeyer-Villiger-Monooxygenasen wie der CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 katalysiert.

#### 3.3.1. YqjM aus *Bacillus subtilis*

Die Ene-Reduktase YqjM von *Bacillus subtilis* katalysiert die Reduktion von C=C-Doppelbindungen in ungesättigten Verbindungen mit elektronenziehender Gruppe.<sup>[6,21]</sup> Die

Reaktion kann in zwei Halbreaktionen unterteilt werden. Im ersten Schritt wird der interne Cofaktor Flavin Mononukleotid (FMN) durch ein Molekül NAD(P)H reduziert und oxidiertes NAD(P)<sup>+</sup> verlässt das Reaktionszentrum. Das Substratmolekül kann binden und im zweiten Schritt, wird das Reaktionszentrum unter Reduktion der C=C-Doppelbindung im Substratmolekül wieder oxidiert (Abbildung 4).<sup>[2,22]</sup>



**Abbildung 4** Reaktionsverlauf der YqjM-katalysierten En-Reduktion. In der reduktiven Halbreaktion wird das Reaktionszentrum reduziert und in der oxidativen Halbreaktion wieder oxidiert. Die Oxidation geht mit der Reduktion des Substrates (Sub) einher. (adaptiert von Assil Companioni und Büchenschütz et. al.<sup>[2]</sup>)

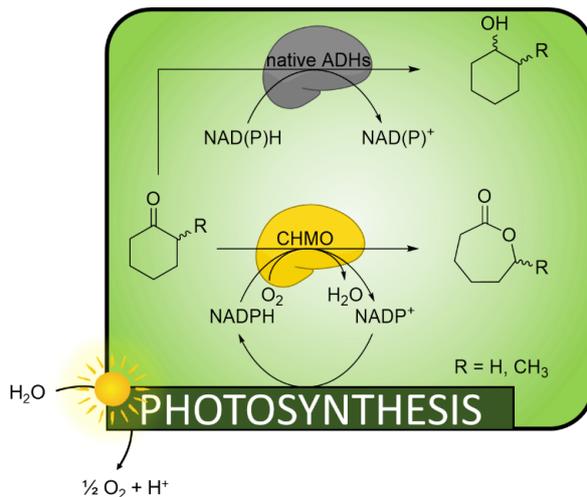
Die wichtigste Modellreaktion für lichtgetriebene En-Reduktionen in *Synechocystis* stellt die Reduktion von 2-Methylmaleimid zu 2-Methylsuccinimid dar (Abbildung 3A).<sup>[2,6]</sup> Die dabei beobachtete spezifische Zellaktivität von über 123 U/g<sub>CDW</sub> repräsentiert nach wie vor die höchste je beschriebene Aktivität für rekombinante *Synechocystis* Zellen. Jedoch ist eine weitere Steigerung der Zellproduktivität notwendig, damit die lichtgetriebene En-Reduktion mit heterotrophen Systemen konkurrieren kann. Aus diesem Grund eignet sich besonders diese schnelle Reaktion, um mögliche Limitierungen zu identifizieren und zu beheben. Zudem stellt das System eine gute Grundlage für erste Upscaling-Experimente dar.

### 3.3.2. Iminreduktasen

Iminreduktasen (IREDs) wie die IRED-A aus *Streptomyces* sp. GF3587<sup>[23,24]</sup> (Abbildung 3B) wurden als weiteres Modellsystem für reduktive Biotransformationen gewählt. IREDs stellen eine umweltfreundliche Alternative für die stereoselektive Bildung von Aminen dar. Da diese strikt NADPH-abhängig sind und bevorzugt in Ganzzellbiotransformationen angewendet werden, eignet sie sich besonders für die Anwendung in phototrophen Organismen.<sup>[1]</sup> In diesem Projekt wurden drei Iminreduktasen ausgewählt, die zuvor intensiv charakterisiert wurden.<sup>[24]</sup> In dieser Studie stellte sich (*R*)-selektive IRED-A als besonders aktiv gegenüber kleineren, zyklischen Iminen heraus, während IRED-M aus *Saccharothrix espanaensis* ATCC 51144 größere Substrate bevorzugte.<sup>[24]</sup> IRED-J aus *Kribbella flavida* DSM 17836 wurde als beste (*S*)-selektive IRED ausgewählt.<sup>[24]</sup>

### 3.3.3. CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871

Die Cyclohexanon Monooxygenase (CHMO) aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 katalysiert die Integration eines Sauerstoffmoleküls aus molekularem Sauerstoff in gesättigte, zyklische Ketone wie Cyclohexanon (Abbildung 3). Die Cyclohexanon Monooxygenase (CHMO) aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 wurde bereits in einer vorangegangenen Studie als Modelenzym in *Synechocystis* untersucht.<sup>[7]</sup> Verschiedene zyklische Ketone konnten erfolgreich zum entsprechenden Laktone umgesetzt werden, die beschriebenen spezifischen Aktivitäten von 2-5 U/g<sub>CDW</sub> waren jedoch niedrig.<sup>[7]</sup> Die Identifizierung möglicher, limitierender Faktoren und deren Behebung könnten die Reaktion optimieren.

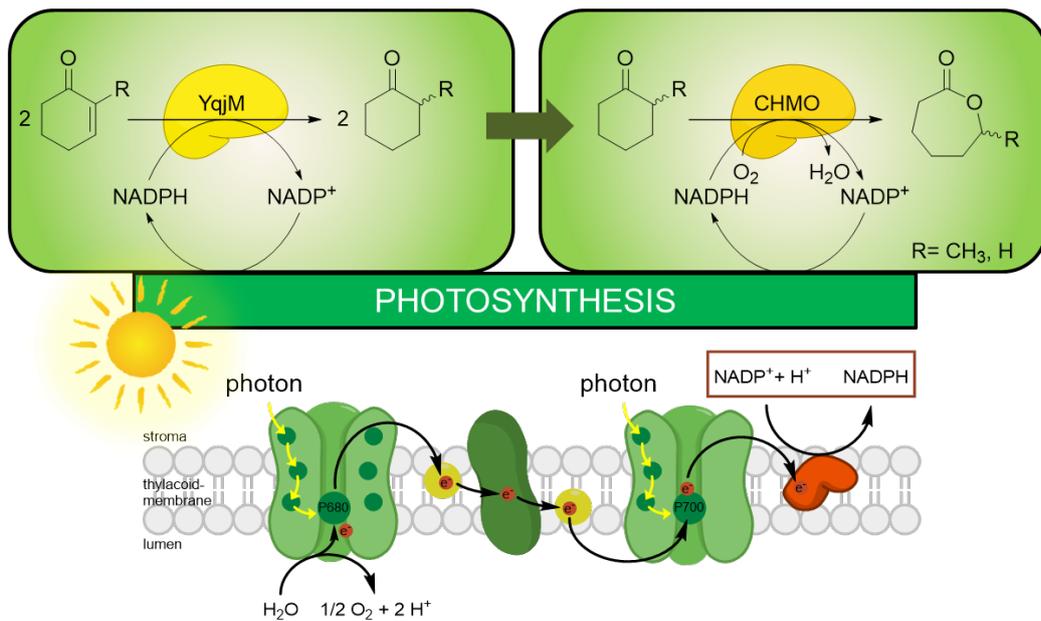


**Abbildung 5** Oxyfunktionalisierung in *Synechocystis Pcp::CHMO*. Die Reaktion wird durch eine konkurrierende Nebenreaktion gestört.

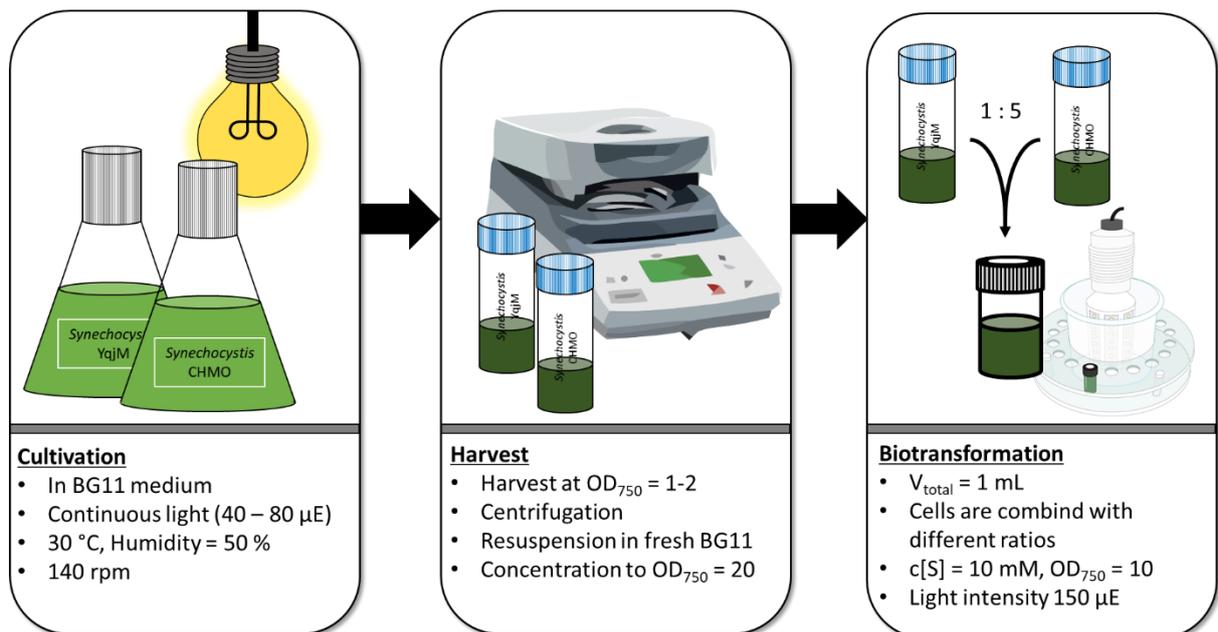
### 3.4. Kaskadenreaktion zur Unterdrückung der Nebenreaktion

#### 3.4.1. Konzept der Kaskadenreaktion

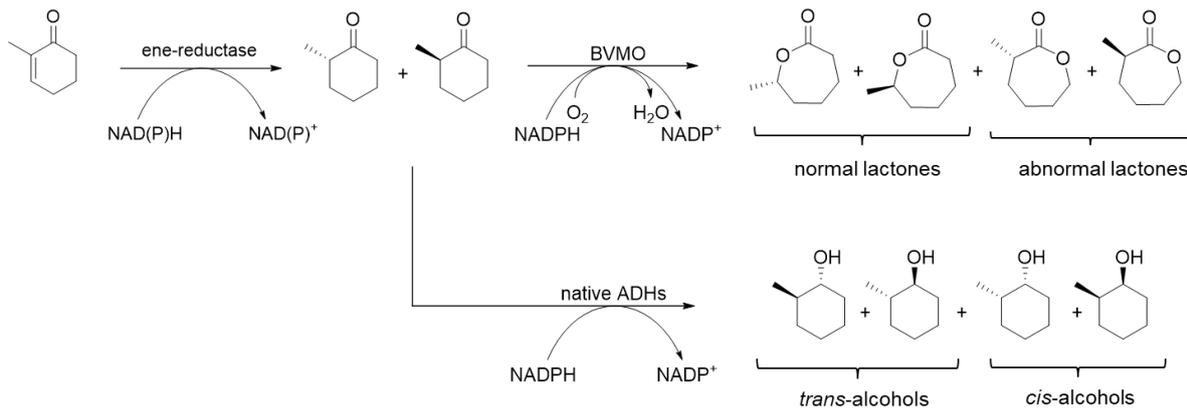
Ganzzellbiotransformationen bergen das Risiko von Nebenreaktionen durch den nativen Enzympool des Produktionswirts. Ein Problem bei der Betrachtung der Oxyfunktionalisierung in *Synechocystis* ist die konkurrierende Ketoreduktion. Native Alkoholdehydrogenasen reduzieren das gesättigte Keton zum Alkohol und stören so die Effizienz der Reaktion (Abbildung 5).<sup>[7]</sup> Der Anteil der Ketoreduktion hängt vom Substrat und dem verwendeten Stamm ab und kann bis zu 80 % des Gesamtumsatzes betragen (siehe Zwischenbericht S. 22). Da die Ketoreduktion langsamer abläuft als die Oxyfunktionalisierung, lässt sich die Nebenreaktion durch die Beschleunigung der CHMO-Reaktion vermindern. Eine weitere Idee wäre die Minimierung der Ketonkonzentration, um das bevorzugte Gleichgewicht in Richtung Laktombildung zu begünstigen. Dies kann durch die Kombination der YqjM und CHMO katalysierten Reaktion erreicht werden (Abbildung 6) und wurde im Rahmen des Projektes mit dem Mischkulturenansatz untersucht (Abbildung 7). Durch diesen Ansatz lassen sich unterschiedliche Produktions- und Aktivitätslevel der beiden Enzyme kompensieren. Das Konzept ist aus mehreren Gründen relevant für den Fortschritt auf diesem Gebiet. Zum einen können mögliche Limitierungen für zukünftige Kaskadenreaktionen in *Synechocystis* evaluiert werden. Zum anderen kann die En-Reduktion mit einem prochiralen Substrat wie 2-Methylcyclohexenone gestartet werden. Mit 2-Methylcyclohexenon als Substrat könnte die Kaskade in einem komplexen Reaktionsgemisch mit mehreren Stereoisomeren für die involvierten Verbindungen resultieren (Abbildung 8). Unter Verwendung stereoselektiver Enzyme wird so die Produktion enantiomerenreiner Laktone oder enantiomerenreiner Alkohole ermöglicht.



**Abbildung 6** Kaskadenreaktion mit YqjM und CHMO. Beide Enzyme werden in separaten Zellen exprimiert, die dann für Ganzzellbiotransformationen miteinander gemischt werden.



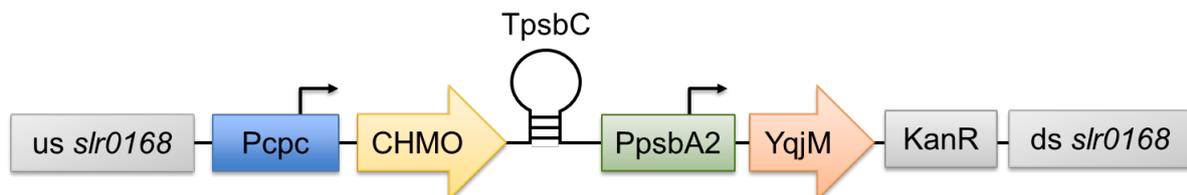
**Abbildung 7** Mischkulturenansatz für die Kaskadenreaktion. Beide Enzyme werden in getrennten Zellen produziert und für die Biotransformation in verschiedenen Verhältnissen kombiniert.



**Abbildung 8** Reaktionsgemisch unter der Verwendung des prochiralen Substrates 2-Methylcyclohexenon und unselektiven Enzymen.

### 3.4.2. Koexpression von YqjM und CHMO

Neben dem Mischkulturen wurde auch die Koexpression beider rekombinanten Gene in *Synechocystis* angestrebt. Dies würde den Reaktionsaufbau vereinfachen und mögliche Transportprobleme minimieren. Da zum Zeitpunkt der Klonierung die genetische Instabilität der  $P_{cpc}$ CHMO nicht bekannt war, wurde in der Integrationskassette die CHMO vom  $P_{cpc}$  Promoter und YqjM vom  $P_{psbA2}$  Promoter kontrolliert. Beide Gene sind durch den  $T_{psbC}$  Terminator getrennt. Die ganze Integrationskassette ist in Abbildung 9 dargestellt. Der  $T_{psbC}$  Terminator ist der nativer, Rho- unabhängiger Terminator des *psbC*-Gens aus *Synechocystis*. Dieses kodiert für das CP43 Reaktionszentrum des Photosystems II.<sup>[14]</sup> Der Terminator wurde von Liu *et al.*<sup>[14]</sup> charakterisiert und konnte die Transkription im Vergleich zu den anderen untersuchten, nativen Terminatoren am besten beenden.<sup>[14]</sup>



**Abbildung 9** Integrationskassette für die Koexpression von CHMO und YqjM in einem *Synechocystis*-Stamm. us *slr0168*: upstream Sequenz des Genlokus *slr0168*, PcpC: cpc-Promoter, CHMO: CHMO-Gen, TpsbC: ein nativer Terminator aus *Synechocystis*, PpsbA2: psbA2 Promoter, YqjM: YqjM-Gen, KanR: Kanamycin Resistenz, ds *slr0168*: downstream Sequenz des Genlokus *slr0168*

## 3.5. Limitierungen von licht-getriebenen Biotransformationen

### 3.5.1. Toxizität und Transport

Die Cofaktorregeneration über Photosynthese setzt voraus, dass die Zellen vital und photosynthetisch aktiv sind. Substrate und Produkte, die in größeren Mengen toxisch für das Zellsystem sind, könnten licht-getriebene Biotransformationen limitieren.<sup>[1,2]</sup> Zum Teil kann dies über das Prozessdesign behoben werden.<sup>[9,10]</sup>

Da die heterologe Reaktion in den Zellen abläuft, könnten auch Import- und Exportprobleme von Substraten/Produkten eine Schwierigkeit darstellen.<sup>[25]</sup> Bisher ist dies für *Synechocystis* allerdings kein beschriebenes Problem.

### 3.5.2. Selbstschattierung

Die photosynthetische Aktivität von Cyanobakterien hängt von der Lichtverfügbarkeit für die Zellen ab. Daher stellt die optimale Beleuchtung der Zellen in Photobioreaktoren eine sehr große Herausforderung bei der Etablierung photobiokatalytischer Prozesse dar.<sup>[26]</sup> Bei der Verwendung von heterotrophen Bakterien und Hefen wird eine Steigerung der volumetrischen Produktion durch eine Erhöhung der Zelldichte erreicht. Durch das Phänomen der Selbstschattierung ist dies bei phototrophen Organismen nur begrenzt möglich. Zellen schirmen sich bei höheren Zelldichten gegenseitig ab und die Lichtverfügbarkeit sowie die photosynthetischen Aktivität werden reduziert. Eine Erhöhung der Lichtintensität behebt das Problem nur bedingt, da es bei ungenügender Mischung der Kultur zur inhomogenen Lichtverfügbarkeit und zur Bildung von hellen und dunklen Zonen kommt.<sup>[27]</sup> Zellen an der Außenseite erfahren zu viel Licht, was im schlimmsten Fall zu Photoinhibition führt, während Zellen in der Mitte der Kultur lichtlimitierend wachsen. Beides hat Auswirkungen auf den Metabolismus der Zellen<sup>[26]</sup> und das Ergebnis der Biotransformation. Daher sind lichtgetriebene Biotransformationen bisher noch auf wenige Gramm Zellen pro Liter beschränkt.<sup>[2]</sup>

### 3.5.3. Konkurrierende Elektronensenken

Im Verlauf des Projektes wiesen verschiedene Experimente darauf hin, dass die eingebrachte En-Reduktion durch die NADPH-Verfügbarkeit limitiert wird. Um den Elektronenfluss zur gewünschten Reaktion zu optimieren, wurde das Ausschalten von konkurrierenden Elektronensenken in Betracht gezogen. Als Elektronensenken werden alternative Elektronentransportwege bezeichnet, die Elektronen aus dem Pool an reduzierten Reaktionsäquivalenten abziehen und das System so vor Überreduktion schützen. Zum Beispiel resultiert eine erhöhte Lichtintensität in einer gesteigerten Photosyntheserate, die den Bedarf der Zelle übersteigt. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und Photoinhibition könnten die Folge sein.

Zwei Elektronensenken sind in Abbildung 1 dargestellt. Der NAD(P)H-Dehydrogenase ähnliche Komplex 1 (NDH1) leitet Elektronen zurück zum Plastochinonpool.<sup>[28,29]</sup> Durch diesen zyklischen Elektronentransport werden Protonen auf die Lumenseite der Thylakoidmembran gepumpt. Eine aktuelle Studie zeigt, dass die Photosyntheserate des Cyanobakteriums *Synechococcus* sp. PCC 7002 durch eine Inaktivierung des NDH1-Komplexes gesteigert werden kann.<sup>[28]</sup> Gleichzeitig wurde erhöhte Aktivität für die heterologe O-Deethylierung von 7-Ethoxyresorufin durch eine P450 Monooxygenase beobachtet.<sup>[28]</sup>

Für dieses Projekt sind besonders Flavodiironproteine (FDPs) von Interesse (Abbildung 1). Unter bestimmten Bedingungen können FDPs bis zu 60 % der photosynthetisch entstanden Elektronen von reduziertem Ferredoxin<sup>[29,30]</sup> zurück auf Sauerstoff umleiten.<sup>[31]</sup> Diese Reaktion ist gegensätzlich zu der am PSII stattfindenden Wasserspaltung, sodass man von einem Wasser-Wasser-Zyklus spricht. Unter natürlichen Lebensbedingungen mit fluktuierenden Licht sind FDPs für das Überleben von phototrophen Bakterien essenziell, verlieren unter kontrollierten Kultivierungsbedingungen jedoch ihre Relevanz.<sup>[32,33]</sup> Stattdessen könnten Elektronen, die über den Wasser-Wasser-Zyklus verloren gehen, auf die heterologe Reaktion umgeleitet werden, wenn die FDPs inaktiviert werden.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Synthese der Ausgangsverbindungen und Etablierung der Analytik

Die Ergebnisse beziehen sich auf Unterpunkt 1.5.1 im Antrag.

#### 4.1.1. Zusammenfassung

Die Synthese kommerziell nicht erhältlicher Ausgangsverbindungen und analytischer Standards ist essenziell, um die Aktivität der Enzyme in Cyanobakterien analysieren zu können. Alle benötigten Verbindungen wurden erfolgreich und in ausreichender Menge von Chiracon synthetisiert. Außerdem konnte die Analytik für die quantitative Analyse relevanter Substrate und Produkte mittels Gas-Chromatographie erfolgreich bei Chiracon und an der TU Graz etabliert werden (s. Zwischenbericht von 2019 S. 6). Diese Ziele wurden als Meilenstein 1 formuliert und wurden ohne Schwierigkeiten erreicht.

#### 4.1.2. Synthesen Chiracon

Alle von Chiracon synthetisierten Substanzen und ihr Verwendungszweck sind in Tabelle 1 aufgeführt. Ein besonderer Fokus wurde auf die Synthese von 2-Methylmaleimid gesetzt, da es in größeren Mengen für Biotransformationen benötigt wurde.

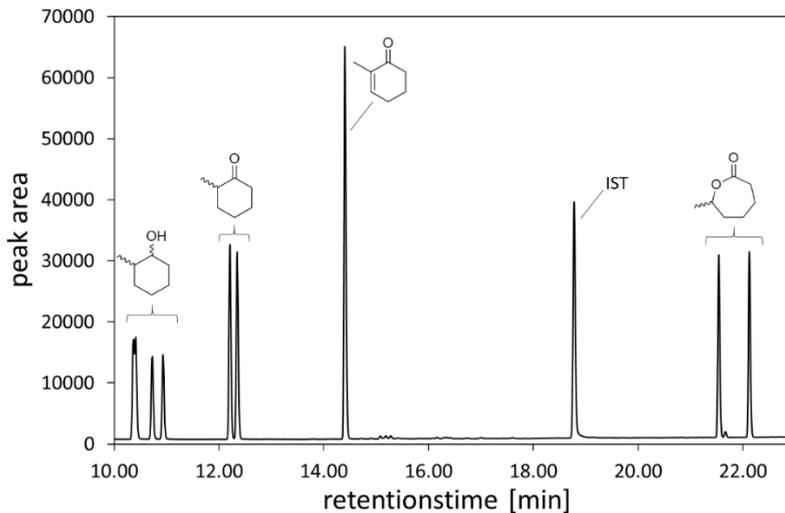
**Tabelle 1** Synthetisierte Substanzen von Chiracon.

Substanz	Synthetisierte Menge	Verwendungszweck
2-Methylmaleimid	11,49 g	Substrat für Ene-Reduktion mit YqjM exprimierenden <i>Synechocystis</i> Stämmen
N-Methyl-2-Methylmaleimid	4,53 g	Substrat für Ene-Reduktion mit YqjM exprimierenden <i>Synechocystis</i> Stämmen
7-Methylohexanone	6 mL	Produktstandard für Oxyfunktionalisierung mit CHMO exprimierenden <i>Synechocystis</i> Stämmen
4-Methylohexanone/ 6-Methylohexanone	5.69 g	Produktstandard für Oxyfunktionalisierung mit CHMO exprimierenden <i>Synechocystis</i> Stämmen
(R)-N-Methyl-2-methylsuccinimid	1.75 g	Produktstandard für Ene-Reduktion mit YqjM exprimierenden <i>Synechocystis</i> Stämmen
rac-2-Methylsuccinimid	1.59 g	Produktstandard für Ene-Reduktion mit YqjM exprimierenden <i>Synechocystis</i> Stämmen

#### 4.1.3. Chirale Analytik

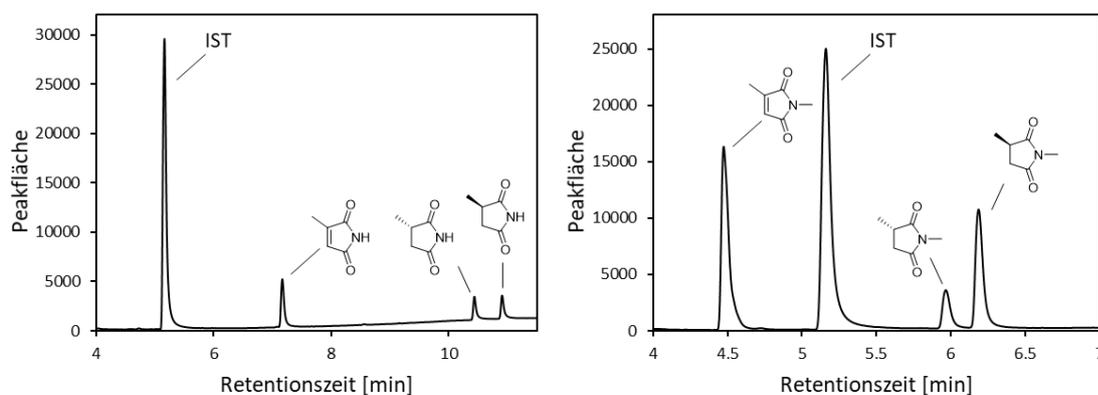
Durchgeführte Biotransformationen wurden über Gas-Chromatographie (GC) analysiert und quantifiziert. Mithilfe der erhaltenen Produktstandards konnten die erforderlichen GC-Methoden etabliert werden. Die Entwicklung der chiralen Analytik stand besonders im Vordergrund, da diese benötigt wurde, um die Selektivität der untersuchten Reaktionen zu bestimmen.

Die Chiralanalytik für die Kaskadenreaktion mit dem prochiralen 2-Methylcyclohexenone als Substrate stellte sich als besonders komplex. Auf der Hydrodex- $\beta$ TBDAC Säule (Macherey & Nagel, Deutschland) war es schließlich möglich, die Ketonenantiomere (*S*)-2-Methylcyclohexanone und (*R*)-2-Methylcyclohexanone sowie die Lactonenantimere (*S*)-7-Methyloxepanone und (*R*)-7-Methyloxepanone zu trennen. Nur eine Trennung der *trans*-Enantiomere des Nebenprodukts 2-Methylcyclohexanol war nicht möglich (Abbildung 10).



**Abbildung 10** Beispielchromatogramm für die Etablierung der Analytik. Beide Ketonenantimere, die beiden Alkoholenantimere mit *cis*-Konfiguration und beide Lactonenantimere konnten erfolgreich getrennt werden. 1-Decanol wurde als interner Standard (IST) verwendet. Die Peakidentifikation erfolgte mit authentischen Standards und über selektive Enzymreaktionen.

Im letzten Projektteil konnten die erhaltenen Produktstandards *rac*-2-Methylsuccinimid und (*R*)-*N*-Methyl-2-methylsuccinimid dazu verwendet werden, die Chiralanalytik für die En-Reduktion zu entwickeln. Mithilfe dieser Methoden ist es nun möglich, die Enantioselektivität von En-Reduktasen für die Substrate 2-Methylmaleimid und 2-Methyl-*N*-Methylmaleimid an der TU Graz zu bestimmen. Die Produktenantimere konnten auf der Hydrodex  $\beta$ -TBDAC Säule (Macherey & Nagel, Deutschland) erfolgreich getrennt und identifiziert werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11** Methodenentwicklung um die Enantiomere der Produkte *rac*-2-Methylsuccinimid (links) und *rac-N*-Methyl-2-Methylsuccinimid (rechts) über Gas-Chromatographie zu trennen. Als interner Standard (IST) wurde 1-Decanol verwendet.

## 4.2. Molekularbiologische Optimierung von En-Reduktion und Oxyfunktionalisierung

Die Ergebnisse beziehen sich auf Unterpunkt 1.5.4 im Antrag.

### 4.2.1. Zusammenfassung

Ein Problem licht-getriebener Ganzzellbiotransformationen ist die geringe Überexpression rekombinanter Enzyme in *Synechocystis*. Daher war die Etablierung neuer, regulatorischer Elemente ein Hauptziel dieses Projektes und wurde als Meilenstein 4 definiert. Anhand von drei Enzymklassen wurde der Einfluss von drei natürlichen Promotoren aus *Synechocystis* auf die Genexpression untersucht. Die verschiedenen Expressionskassetten konnten erfolgreich in den Suizidvektor SynRekB kloniert und über homologe Rekombination ins Genom integriert werden. Für alle drei Enzyme führte der cpc-Promotor zur stärksten Gen- bzw. Enzymexpression. Allerdings verloren Zellen mit erhöhter CHMO-Produktion nach kurzer Zeit ihre Aktivität. Eine mögliche Toxizität des Enzyms für die Zellen und eine dadurch resultierende genetische Instabilität werden als Hauptgrund für den Aktivitätsverlust vermutet. Auch die Experimente mit dem selbst-replizierende Plasmids pAWG ließen sich schwer reproduzieren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Kopiezahl des Plasmides von Kultivierung zu Kultivierung unterschied (siehe Zwischenbericht 2020, S.11). Da die Genomintegration zu stabilen Stämmen führte, wird diese nach wie vor bevorzugt verwendet, um *Synechocystis* genetisch zu verändern. Messungen der intrazellulären Enzymkonzentration zeigten, dass die Enzymkonzentration nach genomischer Integration stabil in biologischen Replikaten reproduziert werden konnte. Die Untersuchung eines möglichen toxischen Effektes der Enzyme mit induzierbaren Promotoren scheiterte daran, dass der verwendete induzierbare Promoter nur zu eine geringen Enzymkonzentration führte. Weitere induzierbare Systeme (wie die Kombination eines tet-Promoters mit einem Theophyllin-Riboswitch) wurden aus Zeitgründen nicht untersucht.

Der Suizidvektor für die genetische Manipulation von *Synechococcus* sp. PCC 7002 konnte erfolgreich kloniert und transformiert werden, allerdings konnten die Stämme bisher nicht vollständig segregiert werden (siehe Zwischenbericht 2019, S.12) Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der gewählte, endogene Plasmid pAQ1 nicht für die Integration von rekombinanten Genen geeignet ist, die unter Kontrolle starker und konstitutiver Promotoren stehen.

Der Hauptfokus wurde auf die Optimierung der En-Reduktion gelegt. Hier konnte die Produktivität durch das Ausschalten der Flavodiironproteine als konkurrierende Elektronensenke verdoppelt werden. Die erreichte Optimierung der Photosynthese stellt einen Durchbruch auf diesem Gebiet dar und ist ein bedeutender Schritt, damit Cyanobakterien in Zukunft mit anderen Produktionsstämmen konkurrieren können.

#### 4.2.2. Iminreduktion

Für die lichtgetriebene Iminreduktion stellte die Enzymmenge in den Zellen den kritischen Parameter dar. Durch die Verwendung eines stärkeren Promotors konnte die spezifische Aktivität der Zellen von unter 2 U/g<sub>CDW</sub> auf bis zu 21 U/g<sub>CDW</sub> für kleinere, zyklische Imine erhöht werden. *Synechocystis* erwies sich als wenig robust gegenüber der Iminsubstrate. Durch den schnelleren Umsatz konnte die Toxizität der Substrate jedoch abgemildert werden. Die Ergebnisse konnten im Oktober 2019 im Fachjournal ChemCatChem publiziert werden.<sup>[1]</sup>

##### Publikation:

Büchenschütz, H. C., Vidimce-Risteski, V., Eggbauer, B., Schmidt, S., Winkler, C. K., Schrittwieser, J. H., Kroutil, W. & Kourist, R. (2020). Stereoselective Biotransformations of Cyclic Imines in Recombinant Cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ChemCatChem*, 12(3), 726-730.

#### 4.2.3. Molekularbiologische Optimierung der En-Reduktion

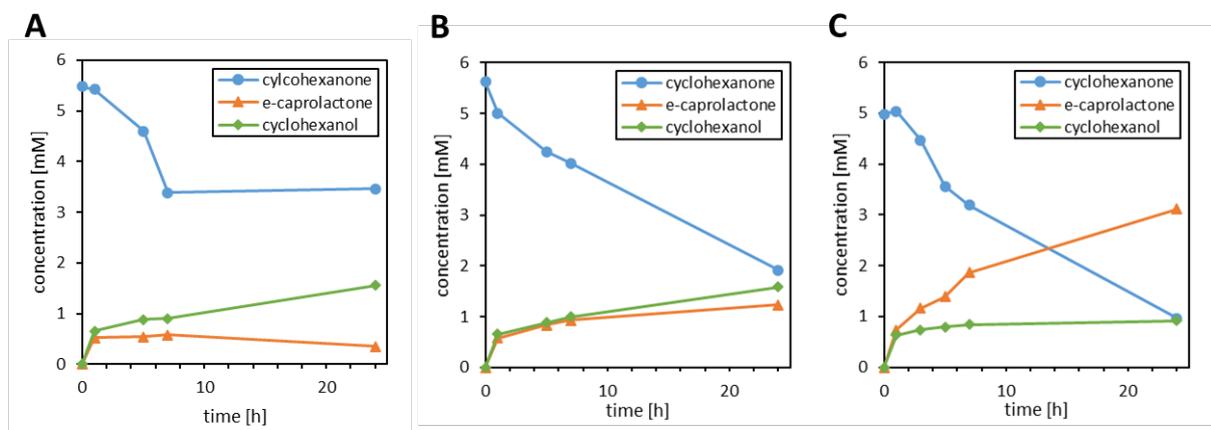
Um die intrazelluläre Enzymkonzentration als Limitierung für die lichtgetriebene En-Reduktion auszuschließen, wurde die YqjM-Expression unter Kontrolle von drei Promotoren untersucht. Dafür wurde die Zellaktivität und die Enzymaktivität im Lysat miteinander verglichen. (s. Zwischenbericht von 2020 S. 18-19). Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Zellaktivität durch die Verwendung der  $P_{cpc}$ -Promoters kaum steigern ließ, obwohl die YqjM-Aktivität im Zellextrakt und die YqjM-Konzentration auf der SDS-PAGE eine erhöhte Enzymkonzentration der Zelle bestätigten. In Kooperation mit Prof. Peter Macheroux (TU Graz) wurde die Kinetik für die Reduktion von 2-Methylmaleimid charakterisiert. Die Oxidation von NADPH wurde als reaktionslimitierender Schritt des Enzyms identifiziert (s. Zwischenbericht von 2020 S. 19-20). Die intrazelluläre NADPH-Konzentration der rekombinanten Stämme in An- und Abwesenheit des Substrats wurde in Kooperation mit Dr. Marc Nowaczyk (Ruhr-Universität Bochum) analysiert. In Anwesenheit von Substrat wurde eine deutlicher Abfall der NADPH-Konzentration detektiert. Dies führte zu der Vermutung, dass die lichtgetriebene Reduktion von 2-Methylmaleimid durch die Cofaktorverfügbarkeit limitiert wird. Im Umkehrschluss wird erwartet, dass das Ausschalten alternativer Elektronensenken die Enzymaktivität steigern sollte. Hier folgten wir dem Vorschlag des Gutachters des Antrages, Flavodiiron-Proteine (FDPs) auszuschalten. Prof. Yagut Allahverdiyeva-Rinne (Universität Turku) stellte Knock-outs dieser FDPs zur Verfügung. Durch die FDP-Knock-outs konnte die Aktivität und die Produktivität der rekombinanten Stämme erheblich gesteigert werden. Dieser Effekt wurde bei Zelldichten von 2.6 g<sub>CDW</sub> L<sup>-1</sup> (OD10) beobachtet, für die angenommen werden kann, dass die Lichtverfügbarkeit durch Selbstschattierung der Zellen verringert ist. Bei geringeren Zelldichten und einer höheren Lichtverfügbarkeit, sowie geringerer Turbidität, wurde der Effekt nicht beobachtet. Die daraus entstandene Publikation wurde im September 2020 in dem Fachjournal *ACS Catalysis* veröffentlicht.<sup>[2]</sup> Weitere Arbeiten sind mit der Kooperationspartnerin Prof. Yagut Allahverdiyeva-Rinne zur Messung von Sauerstoffbildung (Photosynthese), Sauerstoffaufnahme (Atmung) und CO<sub>2</sub>-Fixierung während den Biotransformationen geplant.

Publikation:

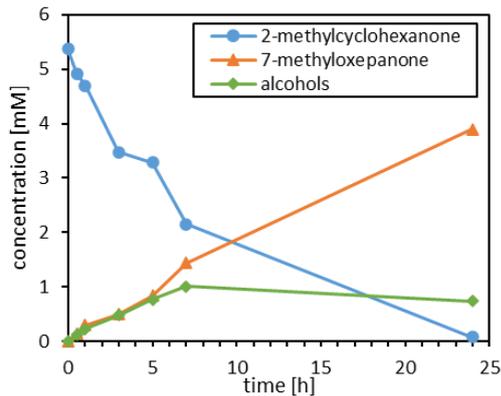
Büchenschütz, H. C., Assil-Companiononi, L., Solymosi, D., Dyczmons-Nowaczyk, N. G., Bauer, K. K., Wallner, S., Macheroux, P., Allahverdiyeva, Y., Nowaczyk, M.M. & Kourist, R. (2020). Engineering of NADPH Supply Boosts Photosynthesis-Driven Biotransformations. *ACS catalysis*, 10(20), 11864-11877.

**4.2.4. Verwendung verschiedener Promotoren vor CHMO**

Für die molekularbiologische Optimierung der Oxyfunktionalisierung wurde dieselbe Strategie wie für die lichtgetriebene Imin- und En-Reduktion verfolgt. Durch den Verlust des Stammes Syn::P<sub>cpc</sub>CHMO, in dem die CHMO Produktion durch den starken cpc-Promotor gesteuert wird, kam es zu einer Verzögerung dieses Projektziels. Neue Klone konnten erst im Dezember 2019 gewonnen werden und die Aktivität von drei Klonen wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Entgegen der Erwartungen und der Erfahrung mit anderen rekombinanten *Synechocystis*-Stämmen, war die Aktivität der biologischen Replikate ist sehr unterschiedlich. Mögliche Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten eine unvollständige Segregation oder eine Mutation in der Expressionskassette sein. Beides konnte durch einen Segregationscheck und die Sequenzierung der Expressionskassette ausgeschlossen werden. Für den aktivsten Klon (Klon 7) konnte eine Aktivität von 4.5 U/g<sub>CDW</sub> berechnet werden. Im Vergleich der ersten Ergebnisse von 2018 von uns (8.4 U/g<sub>CDW</sub>) ist diese Aktivität deutlich geringer.



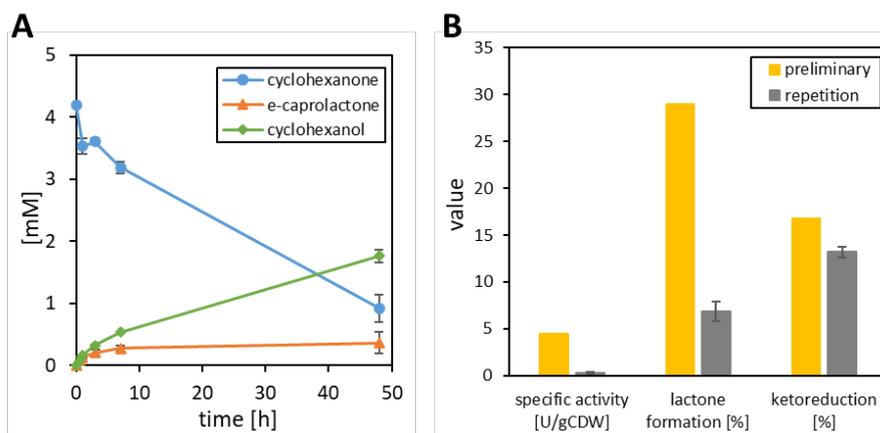
**Abbildung 12** Ganzzellbiotransformationen mit drei P<sub>cpc</sub>::CHMO *Synechocystis* Klonen, A) Klon 2, B) Klon 5, C) Klon 7. Der Konzentrationsverlauf von Substrat (Cyclohexanon), Produkt (ε-Caprolactone) und Nebenprodukt (Cyclohexanol) ist dargestellt. Reaktionsbedingungen: 5 mM Cyclohexanon, V<sub>ges</sub> = 2 mL, T = 30 °C, OD<sub>750</sub> = 10, Lichtintensität = 150 μmol<sub>photones</sub>m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>



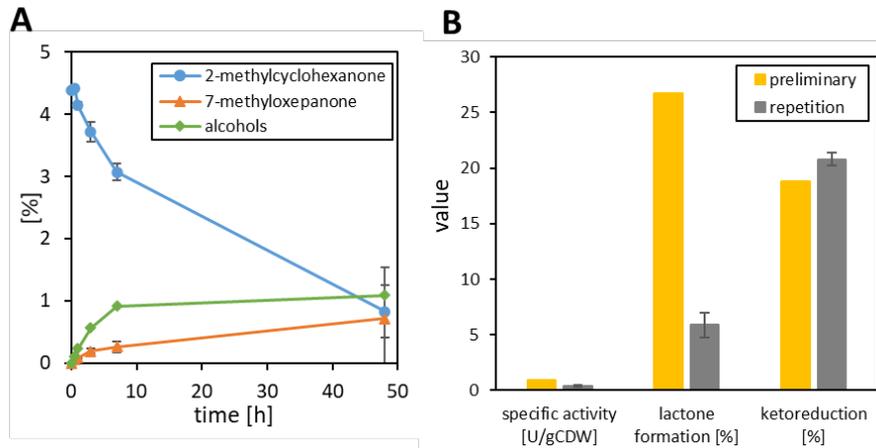
**Abbildung 13** Reaktionsverlauf für den Umsatz von 2-Methylcyclohexanon durch *Synechocystis* Pcp::CHMO, Klon 7. Der Konzentrationsverlauf von Substrate (2-Methylcyclohexanon), Produkt (7-Methyloxeponone) und den Nebenprodukten (Alkohole) ist dargestellt. Reaktionsbedingungen: 5 mM 2-Methylcyclohexanon,  $V_{\text{ges}} = 2 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{OD}_{750} = 10$ , Lichtintensität =  $150 \mu\text{mol}_{\text{photones}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Neben Cyclohexanon wurde auch 2-Methylcyclohexanon als Substrat eingesetzt. Die Aktivität der Klone 2 und 5 war zu gering für eine zuverlässige Quantifizierung. Der Reaktionsverlauf für Klon 7 ist in Abbildung 13 dargestellt. Nach 24 h wurden 71 % Lactonbildung beobachtet, die konkurrierende Ketoreduktion betrug 14 %.

Zwei Wochen später wurden die Biotransformationen mit Klon 7 wiederholt. Der Stamm wurde in drei unabhängigen Kolben angezogen, aufkonzentriert und Reaktionen mit Cyclohexanon und 2-Methylcyclohexanon wurden angesetzt. Lactonbildung, Ketoreduktion und spezifische Aktivität zwischen der ersten Biotransformation und der zweiten Biotransformation wurden miteinander verglichen (Abbildung 14 und Abbildung 15).



**Abbildung 14** Probleme mit der Reproduktion der Biotransformationen mit *Synechocystis* Pcp::CHMO mit Cyclohexanon als Substrate. A) Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Substrat (Cyclohexanon), Produkt ( $\epsilon$ -Caprolacton) und dem Nebenprodukt (Cyclohexanol). B) Lactonbildung, Ketoreduktion und spezifischer Aktivität der ersten Biotransformationen (preliminary) werden mit der zweiten Biotransformationen (repetition) verglichen. Fehlerbalken repräsentieren Daten von drei biologischen Replikaten. Reaktionsbedingungen: 5 mM Cyclohexanon,  $V_{\text{ges}} = 2 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{OD}_{750} = 10$ , Lichtintensität =  $150 \mu\text{mol}_{\text{photones}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$



**Abbildung 15** Probleme mit der Reproduktion der Biotransformationen mit *Synechocystis* PcpC::CHMO und 2-Methylcyclohexanon als Substrate. A) Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Substrat (2-Methylcyclohexanon), Produkt (7-Methyloxepanone) und den Nebenprodukten (Alkohole). B) Laktonbildung, Ketoreduktion und spezifischer Aktivität der ersten Biotransformationen (preliminary) werden mit der zweiten Biotransformationen (repetition) verglichen. Fehlerbalken repräsentieren Daten von drei biologischen Replikaten. Reaktionsbedingungen: 5 mM 2-Methylcyclohexanon,  $V_{\text{ges}} = 2$  mL,  $T = 30$  °C,  $OD_{750} = 10$ , Lichtintensität =  $150 \mu\text{mol}_{\text{photones}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Für beide Substrate zeigten die Zellen eine deutlich reduzierte Aktivität, während die Ketoreduktion konstant blieb. So konnte für die Umsetzung von Cyclohexanon nur noch eine Aktivität von  $0.24 \pm 0.10$  U/g<sub>CDW</sub> festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass der Stamm genetisch instabil ist und bei konstanter Kultivierung nach wenigen Wochen seine Aktivität verliert. Die genauen Gründe dafür konnte bisher nicht identifiziert werden. Detaillierte Untersuchung auf molekulare Ebene sind hier notwendig. Es ist geplant, in weiteren Arbeiten an der AG Kourist alternative BVMOs zu untersuchen. Bei den analogen Iminreduktasen und Enreduktasen (letztere sind auch Flavin-Enzyme) wurden keine Effekte des Promoters  $P_{\text{cpC}}$  auf die genetische Stabilität *Synechocystis* beobachtet. Zur Untersuchung alternativer BVMOs planen wir eine Kooperation mit Dr. Véronique Alphan (Marseille).

### 4.3. Kultivierungsoptimierung von En-reduktion und Oxyfunktionalisierung

Die Ergebnisse beziehen sich auf Unterpunkt 1.5.2 im Antrag.

#### 4.3.1. Zusammenfassung

Eine Optimierung der Kultivierungs- und Reaktionsbedingungen wurde in Hinblick auf ein Upscaling der Reaktionen angestrebt.

Für die En-Reduktion mit den Stämmen Syn::*P*<sub>psbA2</sub>YqjM und Syn::*P*<sub>cpc</sub>YqjM und die Oxyfunktionalisierung mit dem Stamm Syn::*P*<sub>psbA2</sub>CHMO wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die spezifische Zellaktivität an der TU Graz untersucht. Dazu wurde die Zellen unter weißen Leuchtstoffröhren im Wachstumsschrank oder speziellen Wachstumslampen mit blau/rot-Spektrum angezogen. Die Verwendung der blau-roten LEDs führte in beiden Fällen zu einem leichten Anstieg der Aktivität. Die Messung der YqjM-Aktivität in Zellextrakt lässt vermuten, dass die Genexpression durch das blau-rote Licht stärker induziert wird. Da die Lichtsammelkomplex der Photosynthesemaschinerie ihre Absorptionsmaxima im blauen und roten Lichtspektrum haben, könnte die Verwendung des speziellen Lichts die Photosynthesekapazität erhöhen.

Cyano Biotech untersuchte verschiedene Reaktionsbedingungen für die YqjM katalysierte Reduktion von 2-Methylmaleimid in rekombinanten *Synechocystis*. Insgesamt wurde die Reaktion bei OD = 10 und OD = 15 mit drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (15 mM, 20 mM und 30 mM) durchgeführt und die Proben in Graz analysiert. In allen Fällen wurde der Stamm Syn::*P*<sub>cpc</sub>YqjM verwendet und die eingesetzte Substratmenge konnte innerhalb von 6 h umgesetzt werden. Für die Reaktionen wurde der Dünnschichtreaktor der Firma CellDeg GmbH verwendet, der eine optimale Zufuhr von Kohlendioxid und den Abtransport des photosynthetischen Sauerstoffs erlaubt. Durch den Gasaustausch ist der Reaktor nur für Reaktionen mit nicht-flüchtigen Substraten und Produkten geeignet.

Da in den Vorexperimenten eine Zelldichte von  $OD_{750} = 10 = 2.4 \text{ g}_{CDW} \text{ L}^{-1}$  und eine Substratkonzentration von  $c(S) = 30 \text{ mM}$  die beste Aktivität zeigte, wurden diese Parameter für einen großen, 150 mL Ansatz verwendet. Die Reduktion wurde bei Cyano Biotech durchgeführt und in Graz analysiert. Leider ließen sich die Vorexperiment in kleinem Maßstab nicht auf den großen Ansatz übertragen. Dies ist vermutlich auf eine zu geringe Lichtverfügbarkeit im großen Ansatz zurückzuführen. Die Biotransformationen im kleinen Maßstab (1-2 mL) bieten bei geringen bis moderaten Zelldichten offenbar eine erheblich höhere Lichtverfügbarkeit. Dieser Aspekt wird bei späteren Arbeiten zur Skalierung stärker berücksichtigt werden. Da kein vollständiger Umsatz erreicht wurde, hätte sich eine Aufarbeitung des Produktes zu diesem Zeitpunkt nicht gelohnt.

Zusammenfassend erfordert das Upscaling eine neue Herangehensweise. Sowohl Reaktor und Reaktionsbedingungen müssen an die Reaktion und ihre limitierenden Faktoren angepasst werden. Zu diesem Zweck wird momentan ein neuer Reaktor an der TU Graz untersucht. Dieser verwendet kleine LEDs, die im magnetischen Feld Licht emittieren und sich

daher für die Anwendung innerhalb eines Reaktors eignen.<sup>[27]</sup> Dadurch kann die Selbstschattierung, die mit einem erhöhten Durchmesser des Reaktors einhergeht, vermindert werden.<sup>[27]</sup> In dem Reaktor konnten 10 mM 2-Methylmaleimid erfolgreich im 200 mL Ansatz umgesetzt werden.

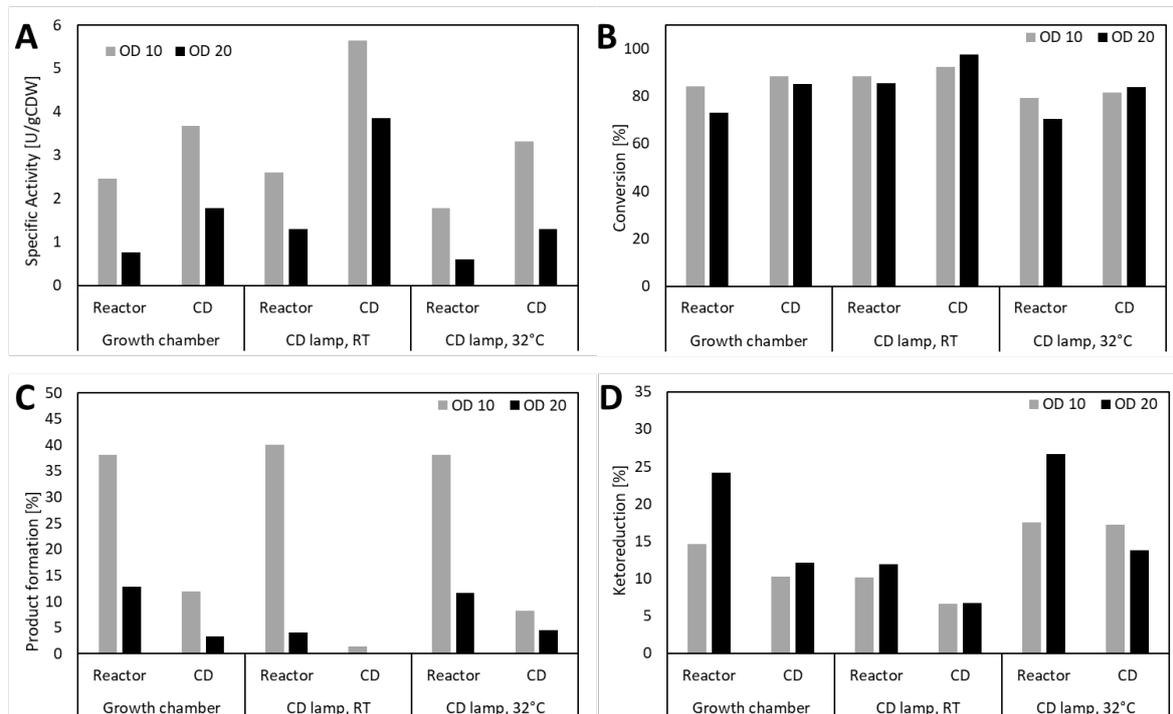
#### 4.3.2. Einfluss der Kultivierung auf die Oxyfunktionalisierung

Für den Stamm Syn::P<sub>psbA2</sub>CHMO wurden drei verschiedene Kultivierungsbedingungen untersucht:

- (1) Leuchtstoffröhre (Weißlicht) im Wachstumsschrank (Witeg), 60  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 30 °C
- (2) Blau-Rote LEDs (CellDeg)<sup>[2]</sup>, 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , RT
- (3) Blau-Rote LEDs (CellDeg)<sup>[2]</sup>, 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 32 °C

Alle Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben (300 mL) in BG11 Medium (100 mL) angezogen und bei einer  $\text{OD}_{750} = 1-2$  für Biotransformationen geerntet. Die Oxyfunktionalisierung von Cyclohexanon (5 mM) wurden im 2 mL-Maßstab, bei zwei verschiedenen Zelldichten ( $\text{OD}_{750} = 10$ ,  $\text{OD}_{750} = 20$ ) und unter zwei verschiedenen Lichtquellen durchgeführt:

- (1) Leuchtstoffröhre (Weißlicht), 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 30 °C
- (2) Blau-Rote LEDs (CellDeg)<sup>[2]</sup>, 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , RT



**Abbildung 16** Vergleich verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Oxyfunktionalisierung von Cyclohexanon. Die Zellen wurden entweder im Wachstumsschrank (Witeg) oder unter blau-roten LEDs (CellDeg) bei 30 °C oder 32 °C angezogen. A) Die spezifische Aktivität und B) der Umsatz nach 24 h wurden aus dem Abfall der Cyclohexanon-Konzentration berechnet. C) Detektierte Bildung von  $\epsilon$ -Caprolacton nach 24 h. D) Anteil der Ketoreduktion. Die Werte für OD = 10 repräsentieren Daten von zwei biologische Replikate

In allen Fällen konnte nach 24 h kein Substrat in der Reaktionslösung detektiert werden. Die Substratabnahme war schneller in Reaktionen, die unter blau-rottem Licht durchgeführt wurden und die Zellen bereits unter diesem Licht kultiviert worden sind. Die Aktivität bei  $OD_{750} = 10$  war größer als bei  $OD_{750} = 20$ , dies könnte durch Selbstschattierung der Zellen bei höheren Zelldichten erklärt werden.

Bei der Detektion des Produkts wurden große Unterschiede festgestellt. In den ersten 2 h der Biotransformation kam es zu einer vergleichbaren Substratabnahme und Produktzunahme. Nach 24 h konnte in den Reaktionen unter blau-rottem Licht fast kein Lakton detektiert werden, während Reaktionen mit den gleichen Zellen aber unter weißem Licht diesen Effekt reduziert zeigten. Die Laktonabnahme war stärker, wenn die Zellen schon unter blau-rottem Licht kultiviert wurden und die Reaktion bei  $OD = 20$  durchgeführt wurde. Zeitgleich wurde auch eine Abnahme der Massenbilanz beobachtet, die darauf schließen lässt, dass es zu einer Hydrolyse des Laktons gekommen ist. Die Hydroxysäure lässt sich über Gas-Chromatographie nicht detektieren. Untersuchung mit pH-Testpapier ergab keinen signifikanten Unterschied im pH zwischen den Reaktionen. Die Kettoreduktion war bei  $OD_{750} = 20$  stärker. Da eine erhöhte Zelldichte auch eine erhöhte Präsenz von Alkoholdehydrogenasen bedeutete, war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Eine Kultivierung bei 32 °C und unter blau-roten LEDs führte zu einer schlechteren Zellaktivität.

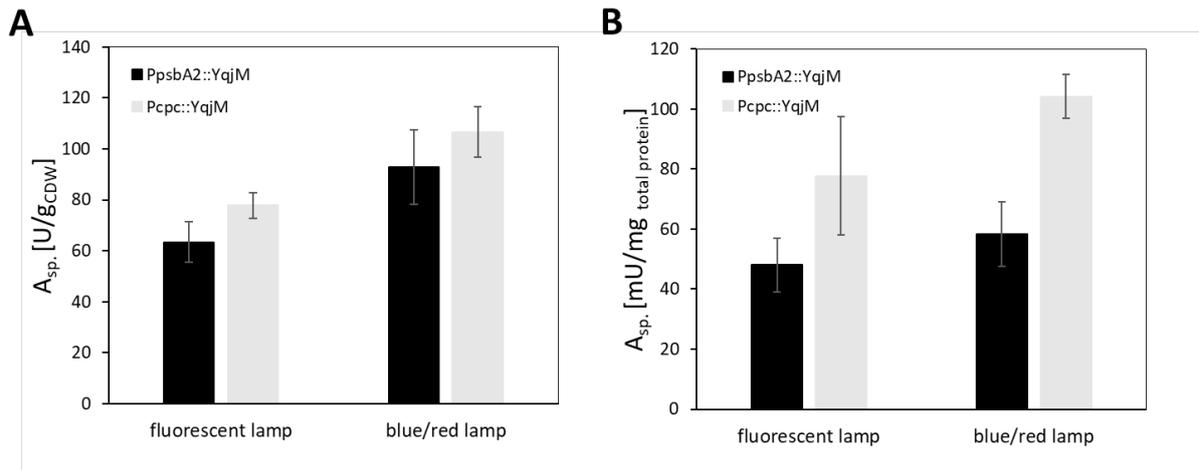
Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Verwendung von blau-roten Lampen für die Kultivierung und die Reaktion der Oxyfunktionalisierung mit dem Stamm Syn::P<sub>psbA2</sub>::CHMO vorteilhaft sein könnten. Da die Absorptionsmaxima der Photosynthesemaschinerie in diese Lichtbereiche fallen, ließen sich die Ergebnisse durch eine erhöhte NADPH-Bildung im Zuge der gesteigerten Photosynthesekapazität erklären. Weitere Experimente sind notwendig, um diese Hypothese zu stützen. Außerdem müssen die Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden, um die Hydrolyse des Laktons zu verhindern. Zur Untersuchung alternativer BVMOs und Reaktionsbedingungen planen wir eine Kooperation mit Dr. Véronique Alphand (Marseille).

### 4.3.3. Einfluss der Kultivierung auf die En-Reduktion

Zwei verschiedene Lichtbedingungen wurden für die Kultivierung der Stämme Syn::P<sub>psbA2</sub>YqjM und Syn::P<sub>cpc</sub>YqjM gewählt. Die nachfolgende Biotransformation wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt (30 °C, 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), dazu wurde der selbst-konstruierte Lichtreaktor von Özgen et al. verwendet.<sup>[34]</sup>

(4) Leuchtstoffröhre im Wachstumsschrank (Witeg), 60  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 30 °C

(5) Blau-Rote LEDs (CellDeg)<sup>[2]</sup>, 150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , RT

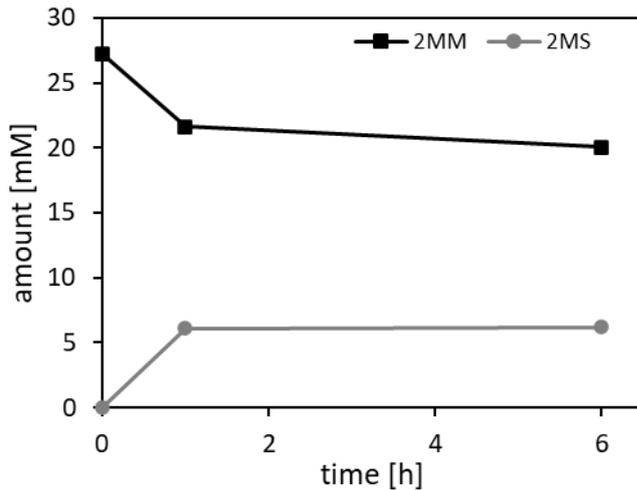


**Abbildung 17** Einfluss der Lampe und Lichtintensität auf die A) die spezifische Zellaktivität und B) die YqjM-Aktivität im Zellextrakt.

Durch die erhöhte Lichtintensität und die blau-roten LEDs konnte die Aktivität von beiden Stämmen gesteigert werden. Der Unterschied der spezifischen Aktivität zwischen Syn::P<sub>psbA2</sub>YqjM und Syn::P<sub>cpc</sub>YqjM ist nicht signifikant. Dies entspricht den publizierten Ergebnissen, dass die Reaktion durch NADPH limitiert ist.<sup>[2]</sup> Der Aktivitätsanstieg könnte sich durch eine leichte Steigerung der photosynthetischen Aktivität unter blau-roten LEDs erklären. Die Experimente im Zellextrakt zeigen, dass die Enzymproduktion in Syn::P<sub>cpc</sub>YqjM höher ist als in Syn::P<sub>psbA2</sub>YqjM und durch die Kultivierung unter blau-roten LEDs leicht ansteigt. Da beide Promotoren lichtabhängig sind, könnten sie durch das blau-rote Licht besser induziert werden. Die verwendeten Wellenlängen entsprechen dem Hauptabsorptionsspektrum des Photosyntheseapparats.

### 4.3.4. Analyse des 150 mL Ansatzes

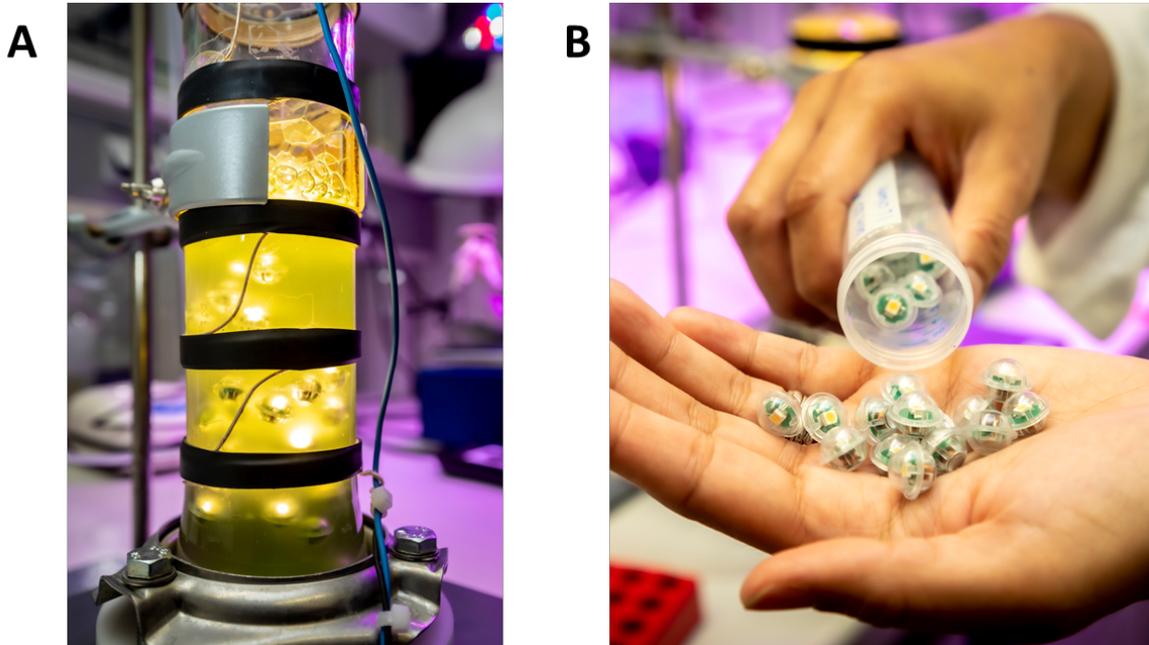
In den Vorexperimenten konnten 30 mM 2-Methylmaleimid (2MM) erfolgreich in einer Biotransformation mit Syn::P<sub>cpc</sub>YqjM (OD<sub>750</sub> = 10) umgesetzt werden. Daher wurden diese Bedingungen für den 150 mL Ansatz gewählt. Eine Analyse der Zeitproben nach 1 h und nach 6 h zeigte, dass die Aktivität der Zellen über die Dauer des Experimentes deutlich abnahm. So wurde in der ersten Stunde noch 6 mM des Produktes 2-Methylsuccinimid gebildet, in den darauffolgenden Stunden stagnierte die Reaktion. Die Ergebnisse weisen auf das Problem hin, dass ein Upscaling der lichtgetriebenen Biotransformation eine andere Herangehensweise erfordert. Aus diesem Grund wurde die Aufarbeitung des Ansatzes aufgeschoben und zu einem alternativen System, dem Bubble Column Reaktor, gewechselt.



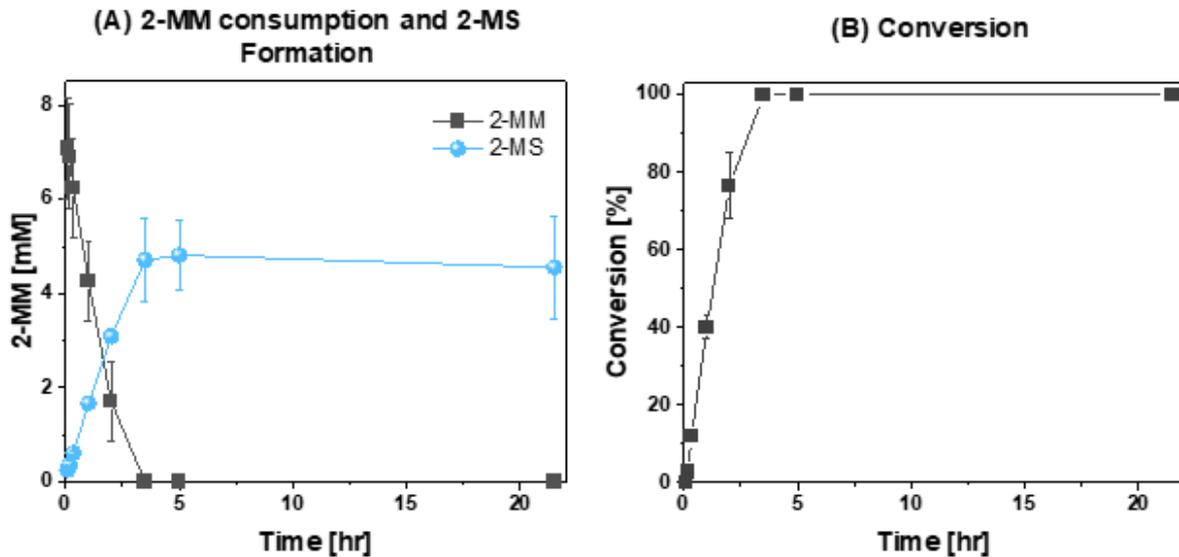
**Abbildung 18** Analyse des 150 mL Ansatzes nach 1 h und nach 6 h. 2MM = 2-Methylmaleimid, 2MS = 2-Methylsuccinimid

#### 4.3.5. Ausblick: Upscaling mit dem Bubble Column Reactor (BCR)

Der Bubble Column Reaktor verwendet kleine LEDs, die im magnetischen Feld Licht emittieren und so eine Beleuchtung der Biotransformation von innen ermöglichen (Abbildung 19). Dadurch kann das Problem der Selbstschattierung vermindert werden.<sup>[27]</sup> Im 200 mL Ansatz konnten 10 mM 2-Methylmaleimid erfolgreich innerhalb von 4 h umgesetzt werden (Abbildung 20). Das System befindet sich noch in der Optimierung und die Reaktion konnte bisher nicht aufarbeitet werden.



**Abbildung 19** A) Biotransformation im Bubble Column Reaktor (BCR). B) LEDs, die im magnetischen Feld Licht emittieren. Bilder: © Lunghammer – TU Graz



**Abbildung 20** Biotransformation im Bubble Column Reactor (BCR). A) Zeitverlauf von Substratabnahme (2MM) und Produktzunahme (2MS). B) Berechneter Umsatz aus der Substratabnahme. 2MM = 2-Methylmaleimid, 2MS = 2-Methylsuccinimid. (Ergebnisse von Dr. Lenny Yap und Marcus Hobisch, die unterstützend hinzugezogen wurden)

#### 4.3.6. Umweltbetrachtung

Auf den ersten Blick stellen Cyanobakterien umweltfreundliche Plattformen für die Produktion von Feinchemikalien dar. Die Verwendung von Sonnenlicht als Energiequelle, Wasser als Elektronendonator, die Produktion von Sauerstoff und die Fixierung von Kohlenstoffdioxid entsprechen der modernen Vorstellung eines grünen Biokatalysators. Das hier präsentierte Konzept verwendet Photosynthese zur effizienten Kofaktorregenerierung für heterologe Enzymreaktionen und löst damit Probleme herkömmlicher Systeme wie die geringe Atomeffizienz oder den Einsatz von Opfersubstraten. Trotz der offensichtlichen Vorteile und vielversprechenden Ergebnisse wollen wir hier auf ein paar Nachteile hinweisen.

Phototrophe Organismen benötigen Licht und die Verwendung von Sonnenlicht wird durch natürliche Schwankungen (Tag-Nacht-Zyklus, Jahreszeiten) erschwert.<sup>[26]</sup> Die Verwendung künstlicher Lichtquellen kann bei konstanten Lichtbedingungen und in Abhängigkeit von der verwendeten Lichtquelle in hohe Energiekosten resultieren. Ein hoher Kostenpunkt großtechnischer Mikroalgenkultivierung ist außerdem die Bereitstellung von CO<sub>2</sub>.<sup>[35]</sup> Robuste Cyanobakterienstämme mit hoher Photosynthesekapazität (insbesondere bzgl. des PET der Lichtreaktionen), ein optimiertes Design von Photobioreaktoren, ggf. die Verwendung erneuerbarer Energieträger sowie auch von Rauchgas und eine umfassende Optimierung der einzelnen Prozessschritte können diese Kostenpunkte und den Einfluss auf die Umwelt reduzieren.

Jedoch bleibt das Problem, dass eine Erhöhung der Zelldichten die Lichtverfügbarkeit und damit die Photosyntheserate phototropher Organismen reduziert. Das damit einhergehende, niedrige Verhältnis von Biokatalyst zu wässriger Kulturlösung resultiert nicht nur in hohen Kosten für das Medium, sondern auch in einer größeren Abfallproduktion. Der im Medium BG11 verwendete Puffer HEPES kostet momentan 225,90 €/kg (Carl Roth, Stand 11.12.2020). Bei einer verwendeten Konzentration von 5 mM enthält ein Liter BG11-Medium

1,2 g HEPES. Es soll an dieser Stelle betont werden, dass es schwierig ist, die Kultivierung von Cyanobakterien in ungepufferten Medien effizient zu kontrollieren (Marc Nowaczyk, Bochum, mündliche Mitteilung 2016), und dass daher der Ersatz des kostenintensiven Puffers eine Herausforderung darstellt. Mit unseren Kultivierungsbedingungen (bis  $OD_{750} = 2$ ) können wir mit einem Liter BG11-Medium nur 0.48  $g_{CDW}$  Zellen anziehen. Dies reicht für eine 200 mL Biotransformation bei  $OD_{750} = 10$  und mit der aktuellen Produktivität im Bubble Column Reaktor ( $2,5 \text{ mM h}^{-1}$ ) für die Produktion von ca. 222 mg 2-Methylsuccinimid. Im 1 mL Maßstab und durch Substratfeeding lässt sich die 6-fache Menge (ca. 1,3 g) Produkt herstellen, jedoch ist der Arbeitsaufwand erheblich größer. Der HEPES Puffer macht bereits 1,22 €/g bzw. 21 ct/g vom Endpreis aus. Die Abfallmenge an Medium beträgt in beiden Fällen ca. 1 L, der autoklaviert und entsorgt werden muss. Da das Produkt durch Extraktion mit Ethylacetat gewonnen wird, fällt zusätzlich organisches Lösungsmittel (ca. 200 mL) als Abfallprodukt an. Der zeitliche Aufwand beläuft sich auf 5 Tagen für die Kultivierung und 1 Tag für die Biotransformation.

In einer vergleichbaren Studie wurde die Produktion von Cyclohexanol in *Synechocystis* im großen Maßstab untersucht und mit der Oxyfunktionalisierung von Styrol in *E. coli* verglichen.<sup>[3]</sup> Die Autoren verwendeten einen 3 L Photobioreaktor mit 1,2 L Medium und 0,4 L Diisononylphthalat (DINP) als organische Phase und erzielten eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $0,04 \text{ g h}^{-1} \text{ L}_{aq}^{-1}$  mit einer Zelldichte von  $0,5 \text{ g}_{CDW} \text{ L}^{-1}$ . 2.6 g Cyclohexanol konnten isoliert werden. Für die Produktion von 72,6 g Styroloxid im gleichen Größenmaßstab wuchsen die *E. coli* Zellen auf eine Zelldichte von  $39,3 \text{ g}_{CDW} \text{ L}^{-1}$  an und die durchschnittliche Raum-Zeit-Ausbeute lag bei  $11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Außerdem erfolgte die Styroloxidproduktion innerhalb von 8 h und die Cyclohexanolproduktion in 52 h.<sup>[3]</sup>

Die Rechnungen verdeutlicht, dass bei momentanen Zelldichten die Produktivität der Zellen deutlich gesteigert werden muss, um im Gramm-Maßstab zu produzieren und mit heterotrophen Systemen konkurrieren zu können. Eine Optimierung der Kultivierungs- und Reaktionsbedingungen und des photosynthetischen Elektronentransports sind notwendige Schritte in die richtige Richtung.

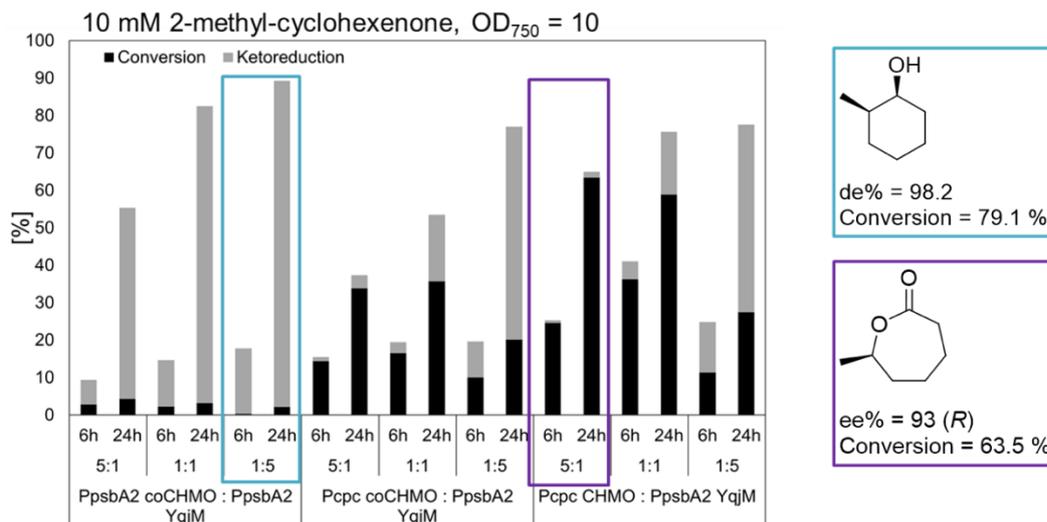
Ein weiterer Punkt stellt die geringe Toleranz von *Synechocystis* gegenüber einigen Substraten dar. Der Einsatz von 5 mM Substrat für die Iminreduktion führte in fast allen Fällen zum Zelltod in wenigen Stunden.<sup>[36]</sup> In Ganzzellbiotransformationen mit *E.coli* konnten bis zu 100 mM vollständig umgesetzt werden.<sup>[24]</sup> Auch die Maleimide zeigten sich toxisch für die Zellen.<sup>[2]</sup> Zwar konnte die Toxizität durch das Beschleunigen der Reaktion vermindert werden, dennoch muss dies für das Upscaling beachtet werden. Substratzufütterung<sup>[2]</sup> und die Verwendung von Zweiphasensystemen<sup>[3,37]</sup> könnten das Problem lösen.

## 4.4. Eine Kaskade zur Unterdrückung einer Nebenreaktion in *Synechocystis*

Neues Projektziel, wurde nicht im Antrag behandelt. Diese Ziel wurde aufgenommen, da die beabsichtigte Oxyfunktionalisierung durch P450 Monooxygenasen bereits von der Gruppe von Andreas Schmid gezeigt wurde.<sup>[3]</sup>

### 4.4.1. Zusammenfassung

Im Kaskadenansatz wird die Konzentration des gesättigten Ketons durch die vorgeschaltete En-Reduktion geringgehalten. Da die Laktombildung schneller ist als die Ketoreduktion wird letzteres durch die Kaskade weiter ausgebremst. Wird für die En-Reduktion ein prochirales Substrat wie 2-Methylcyclohexenone und eine En-Reduktase mit hoher Selektivität eingesetzt, kann enantiomerreines Laktone gebildet werden. Erste Ergebnisse waren sehr vielversprechend (Abbildung 21). Je nach Kombination der vorhandenen CHMO- und YqjM-Stämmen konnte die Reaktion aus Abbildung 8 entweder in Richtung Ketoreduktion oder in Richtung Lactonbildung gesteuert werden. Der limitierende Schritt der Kaskade ist die lichtgetriebene Oxyfunktionalisierung katalysiert von der CHMO. Da das Enzym nur in geringen Mengen in der Zelle produziert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein stärker Promotor vor dem CHMO-Gen die Produktion des Enzyms erhöht und so die Aktivität der Zellen gesteigert wird. Obwohl dies für andere Enzyme gut funktioniert<sup>[1,2]</sup>, verlor der Stamm P<sub>cpc</sub>::CHMO wiederholt innerhalb weniger Wochen an Aktivität. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse für die Kaskade nicht reproduziert werden. Die Gründe für die Instabilität des Stammes müssen untersucht werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung einer andere BVMO.



**Abbildung 21** Die Kombination verschiedener rekombinanter Stämme in unterschiedlichen Verhältnissen führt zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

Da die CHMO (*S*)-2-Methylcyclohexanon als Substrat bevorzugt, YqjM jedoch (*R*)-selektiv ist, wurden zwei (*S*)-selektive Varianten für En-Reduktasen kloniert. Die YqjM-Mutante C25G A60V<sup>[38]</sup> zeigte keinen Selektivität gegenüber 2-Methylcyclohexenone. Zusätzlich wurde die Variante TsOYE C25G I67T<sup>[39]</sup> charakterisiert. Die Variante zeigte eine leichte (*S*)-Selektivität

gegenüber 2-Methylcyclohexenone (ee = 15 % (S)) und ist daher ebenfalls nur wenig geeignet. In Zukunft werden verschiedene En-Reduktasen und andere Substrate für den Ansatz untersucht.

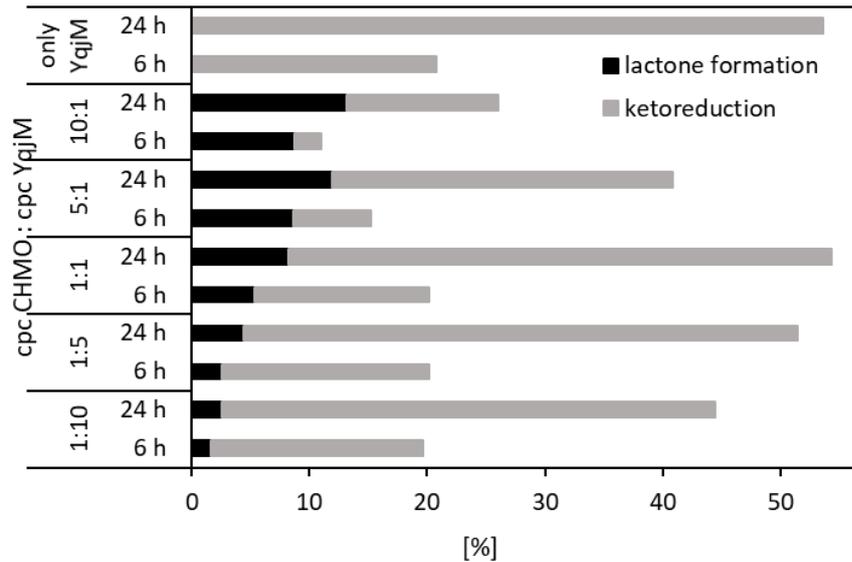
Durch die räumliche Trennung beider Teilreaktionen im Mischkulturenansatz müssen Substrat und Zwischenprodukt problemlos in und aus den Zellen transportiert werden. Die Koexpression von CHMO und YqjM in einer Zelle würde das Transportproblem minimieren und stellt einen interessanten Vergleich zum Mischkulturansatz dar. Daher wurde die Koproduktion beider Enzyme in *Synechocystis* angestrebt und der entsprechende Shuttle Vektor konnte erfolgreich kloniert und in die Zellen gebracht werden. Analyse der Integrationskasse ergaben allerdings Punktmutationen und die Koproduktion von CHMO und YqjM in einer Zelle konnte nicht charakterisiert werden. Auch durch dieses Experiment sehen wir unsere Vermutung bestätigt, dass die starke Expression des CHMO-Gens unter Kontrolle des cpc-Promoters für die Zellen von Nachteil ist.

Zum Schluss wurde die Eigenschaft des Wildtyp-Stamms, gesättigte, zyklische Ketone zu reduzieren, hinsichtlich der Selektivität für 2-Methylcyclohexanon charakterisiert. Mit einer E-Wert 9,66 eignen sich die nativen ADHs nicht für die Racematspaltung von *rac*-2-Methylcyclohexanon. Werden die nativen ADHs aus *Synechocystis* mit YqjM kombiniert, kann der Alkohol (S,R)-2-Methylcyclohexanol in hoher Reinheit hergestellt werden. Die Rückoxidation von Alkohol zu Keton ist unter C-reichen Bedingungen reduziert (siehe Zwischenbericht S. 17-18).

#### 4.4.2. Reproduktionsprobleme der Kaskade

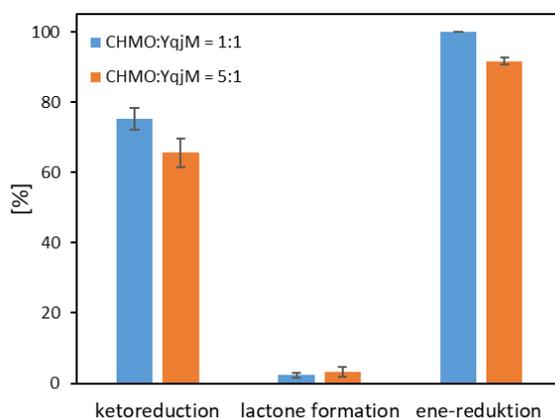
Der neu gewonnene P<sub>cpc</sub>::CHMO-Stamm (Klon 7, siehe Abschnitt 0) wurde zusammen mit dem Stamm *Synechocystis* P<sub>cpc</sub>::YqjM für die Kaskadenreaktion verwendet. Der YqjM-Stamm weist eine höhere Aktivität auf als der Stamm P<sub>psbA2</sub>::YqjM, der 2018 verwendet wurde<sup>[2]</sup> und es wurde erwartet, dass dies einen positiven Effekt auf die Kaskade hat.

Das Ergebnis von 2018 konnte nicht reproduziert werden (Abbildung 22). Von der Einzelreaktion mit dem P<sub>cpc</sub>::CHMO-Stamm war bereits bekannt, dass dieser eine geringere Aktivität aufwies, als der P<sub>cpc</sub>::CHMO-Stamm von 2018. Daher war es nicht erstaunlich, dass die Laktonbildung in der Kaskadenreaktion geringer war. Mit zunehmender Menge an P<sub>cpc</sub>::CHMO stieg der Anteil der Laktonbildung und erreichte seinen Höchstwert von 13 % (ee = 90.7 % (R)) für ein Mischverhältnis von 10:1. Durch die geringe Konzentration des YqjM-Stamms wurden in der Reaktion nur 60 % des eingesetzten Substrates 2-Methylcyclohexenon reduziert. Aus diesem Grund eignet sich das Verhältnis nicht für die Kaskade. Die höchste Ketoreduktion von 53 % wurde in dem Ansatz erreicht, dem kein CHMO-Stamm beigemischt war. Auch dieser Wert war geringer als der im Jahr 2018 erreichte Wert von 79 % Ketoreduktion in 24 h.



**Abbildung 22** Erstes Ergebnis, um die Kaskade von 2018 zu reproduzieren. Die Stämme  $P_{cpc}::CHMO$  und  $P_{cpc}::YqjM$  wurden in verschiedenen Verhältnissen (1:10 bis 10:1) gemischt. 2-Methylcyclohexenon wurde als Substrat zugegeben und die Laktonbildung sowie die Ketoreduktion nach 6 h und 24 h analysiert. Reaktionsbedingungen:  $V_{ges} = 2$  mL, Lichtintensität = 150  $\mu$ E, 10 mM 2-Methylcyclohexenone,  $T = 30$  °C,  $OD_{750} = 10$ .

Zwei Wochen nach dem ersten Ansatz wurde die Kaskade für die Verhältnisse  $P_{cpc}::CHMO$  zu  $P_{cpc}::YqjM$  von 1:1 und 1:5 in biologischen Replikaten wiederholt (Abbildung 23). Es wurde nur die 48 h Probe analysiert, um zu überprüfen, ob die Reaktion erfolgreich war. Wie in Abschnitt 0 bereits diskutiert wird, verlor der Stamm  $P_{cpc}::CHMO$  nach zwei Wochen Kultivierung deutlich an Aktivität. Dies wurde auch durch das Kaskadenexperiment reproduziert. Während die Reduktion des Enons durch YqjM vollständig war, wurden weniger als 2 % des gesättigten Laktons gebildet. Stattdessen wurden 75 % bzw. 66 % des gesättigten Ketons durch die nativen Alkoholdehydrogenasen zum Alkohol reduziert.

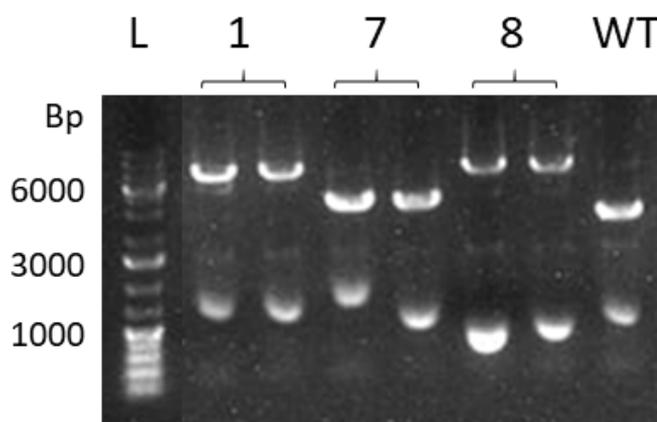


**Abbildung 23** Wiederholung der Kaskade. Die Stämme  $P_{cpc}::CHMO$  und  $P_{cpc}::YqjM$  wurden in den Verhältnissen 1:1 und 5:1 gemischt. 2-Methylcyclohexenon wurde als Substrat zugegeben und die Laktonbildung sowie die Ketoreduktion nach 48 h analysiert. Reaktionsbedingungen:  $V_{ges} = 2$  mL, Lichtintensität = 150  $\mu$ E, 10 mM 2-Methylcyclohexenone,  $T = 30$  °C,  $OD_{750} = 10$

#### 4.4.3. Koexpression von CHMO und YqjM

Das Plasmid SynRekB\_P<sub>cpc</sub>CHMO\_T<sub>psbC</sub>\_P<sub>psbA2</sub>YqjM für die Koexpression von CHMO und YqjM wurde mit der FastCloning-Methode kloniert.<sup>[40]</sup> Dazu wurde zunächst der Terminator T<sub>psbC</sub> aus dem Genom von *Synechocystis* amplifiziert und der Vektor SynRekB\_P<sub>cpc</sub>CHMO\_T<sub>psbC</sub> kloniert. Anschließend wurde die Expressionskassette P<sub>psbA2</sub>YqjM eingefügt. Das Plasmid wurde durch Sequenzierung der gesamten Integrationskassette auf Richtigkeit überprüft und anschließend in *Synechocystis* transformiert.

Insgesamt wuchsen 12 Kolonien auf Platten mit hoher Kanamycinkonzentration an. Alle 12 Klone wurden auf YqjM und CHMO Aktivität untersucht. Dazu wurden Biotransformationen angesetzt die je 1 mM Cyclohexenon und 1 mM Cyclohexanon enthielten. Als Negativkontrolle wurde eine Reaktion ohne Zellen angesetzt. Nach 24 h wurden die Proben mit Gas-Chromatographie analysiert. Alle Klone wiesen eine leicht YqjM-Aktivität auf, da die Konzentration von 2-Methylcyclohexenon zurückging und die Konzentration von 2-Methylcyclohexanon anstieg. Für 6 Klone wurde ein Peak für  $\epsilon$ -Caprolakton gefunden; ein deutliches Zeichen für CHMO-Aktivität. Allerdings lag die Konzentration von  $\epsilon$ -Caprolakton für 5 Klone unter dem Detektionslimit. Die Reaktion mit Klon 8 stach deutlich heraus. Als einzige Reaktion konnte nach 24 h kein 2-Methylcyclohexenon nachgewiesen werden. Außerdem wurde die höchste Konzentration von  $\epsilon$ -Caprolakton detektiert. Die Ergebnisse warfen die Fragen auf, warum Klone aus einem Transformationsansatzes so unterschiedliche Aktivitäten aufwiesen und legten die Vermutung nahe, dass es beim Einbau der Integrationskassette zu Schwierigkeiten kam. Daher wurden neben Klon 8 auch Klon 1 und Klon 7 weiter analysiert. Klon 1 wies einen kleinen Peak für  $\epsilon$ -Caprolakton auf und Klon 7 zeigte keine CHMO-Aktivität. Zunächst wurde ein Segregationscheck gemacht (Abbildung 24).



**Abbildung 24** Segregationscheck von den drei Klonen 1, 7 und 8, welche die Expressionskassette für die beiden Enzyme CHMO und YqjM enthalten sollten. Als Negativkontrolle wurde ein Segregationscheck von dem Wildtyp *Synechocystis* durchgeführt.

Das Gelbild zeigt für Klon 1 und Klon 8 die erwartete Bande für die Integrationskassette. Für Klon 7 wies die Bande eine geringere Größe auf, was bestätigt, dass die Expressionskassette für die Koexpression nicht richtig integriert wurde. Alle Klone zeigten kein Wildtypsignal und sind vollständig segregiert. Die Integrationskassette von Klon 1 und Klon 8 wurden zum Sequenzieren geschickt.

Für Klon 1 wurden mehrere Mutationen in der Integrationskassette gefunden, die sowohl die geringe YqjM als auch die geringe CHMO erklären. Die Expressionskassette für YqjM in Klon 8 ist intakt. Allerdings wies auch Klon 8 die Punktmutation P415S im CHMO-Gen auf, die zu dem Einbau von Serin anstelle von Prolin führte. Interessanterweise wurde diese Mutation auch im Klon 1 gefunden. Das Ergebnis weist darauf hin, dass *Synechocystis* mit einem intakten CHMO-Gen unter Kontrolle des *cpc*-Promoters nicht lebensfähig ist und sich nur Klone mit Mutation durchsetzen. Der Grund dafür bleibt unbekannt.

Zusammenfassend konnten YqjM und CHMO bisher nicht gemeinsam in *Synechocystis* produziert werden. Durch die genetische Instabilität der  $P_{cpc}$ CHMO Expressionskassette, muss nach einem neuen Promotor für die Expression der CHMO oder einer anderen BVMO gesucht werden.

## 5. Publikationsplan

Aus dem Projekt sind zwei Publikationen hervorgegangen:

- (1) Büchsenschütz, H.; Vidimce-Risteski, V.; Eggbauer, B.; Schmidt, S.; Winkler, C.; Schrittwieser, J. H.; Kroutil, W.; Kourist, R. Stereoselective Biotransformation of Cyclic Imines in Recombinant Cells of *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *ChemCatChem* **2020**, *12*(3), 726-730.  
<https://doi.org/10.1002/cctc.201901592>.
- (2) Büchsenschütz, H. C., Assil-Companiononi, L., Solymosi, D., Dyczmons-Nowaczyk, N. G., Bauer, K. K., Wallner, Macheroux, P., Allahverdiyeva, Y., Nowaczyk, M. M., Kourist, R. Engineering of NADPH Supply Boosts Photosynthesis-Driven Biotransformations. *ACS Catalysis* **2020**, *10*(20), 11864-11877.  
<https://doi.org/10.1021/acscatal.0c02601>

Folgende weitere Publikationen sind geplant:

- Fachpublikation zu Biotransformation unter mixotrophen Kultivierungsbedingungen, Skalierung und Umweltbetrachtung.
- Fachpublikation zur Oxyfunktionalisierung in Cyanobakterien und den ungewöhnlichen Problemen mit der genetischen Stabilität des CHMO-Klons in Zusammenarbeit mit Prof. Veronique Alphand (Aix Universität Marseille)
- Buchkapitel zu Cyanobakteriellen Biotransformationen in einem Buch zur Autotrophie

## 6. Meilensteine

Entspricht im Antrag Abschnitt 6.1 (S. 19)

**Tabelle 2** Meilensteinplanung für das Projekt Lichtkatalysierte Biotransformation laut Antrag und mit aktuellem Status.

Meilenstein	Titel	Zeitpunkt	Status
M1	Ausgangsverbindungen für ER-Prozess synthetisiert	9 Monate	abgeschlossen
M2	ER-Biotransformation an Partner CYA transferiert	9 Monate	abgeschlossen
M3	Optimierung des Produktionsprozesses im analytischen Maßstab gezeigt	18 Monate	begonnen
M4	Molekularbiologische Optimierung des ER-Prozess gezeigt	24 Monate	abgeschlossen
M5*	Oxyfunktionalisierung in <i>Synechocystis</i> durchgeführt	24 Monate	begonnen
M6	Ene-Reduktion im Gramm-Maßstab durchgeführt	30 Monate	begonnen

\* Die Oxyfunktionalisierung mit der CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 als zentraler Projektgegenstand

## 7. Referenzen

- [1] H. Büchsenschütz, V. Vidimce-Risteski, B. Eggbauer, S. Schmidt, C. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, R. Kourist, *ChemCatChem* **2019**, cctc.201901592.
- [2] L. Assil-Companiononi, H. C. Büchsenschütz, D. Solymosi, N. G. Dyczmons-Nowaczyk, K. K. F. Bauer, S. Wallner, P. Macheroux, Y. Allahverdiyeva, M. M. Nowaczyk, R. Kourist, *ACS Catal.* **2020**, 11864–11877.
- [3] A. Hoschek, J. Toepel, A. Hochkeppel, R. Karande, B. Bühler, A. Schmid, *Biotechnol. J.* **2019**.
- [4] P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301–312.
- [5] L. Schmermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchsenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, 9, 4115–4144.
- [6] K. Königer, Á. Gómez Baraibar, C. Mügge, C. E. Paul, F. Hollmann, M. M. Nowaczyk, R. Kourist, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 5582–5585.
- [7] S. Böhmer, K. Königer, Á. Gómez-Baraibar, S. Bojarra, C. Mügge, S. Schmidt, M. Nowaczyk, R. Kourist, *Catalysts* **2017**, 7, 240.
- [8] A. Hoschek, B. Bühler, A. Schmid, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56, 15146–15149.
- [9] A. Hoschek, J. Toepel, A. Hochkeppel, R. Karande, B. Bühler, A. Schmid, *Biotechnol. J.* **2019**, 14, e1800724.
- [10] A. Hoschek, B. Bühler, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, DOI 10.1002/bit.27006.
- [11] I. S. Yunus, P. R. Jones, *Metab. Eng.* **2018**, 49, 59–68.
- [12] T. Heidorn, D. Camsund, H.-H. Huang, P. Lindberg, P. Oliveira, K. Stensjö, P. Lindblad, in *Methods in {Enzymology}*, Elsevier, **2011**, pp. 539–579.
- [13] E. Englund, F. Liang, P. Lindberg, *Sci Rep* **2016**, 6, 36640.
- [14] D. Liu, H. B. Pakrasi, *Microb. Cell Fact.* **2018**, 17, 1–8.
- [15] J. Zhou, H. Zhang, H. Meng, Y. Zhu, G. Bao, Y. Zhang, Y. Li, Y. Ma, *Sci. Rep.* **2014**, 4, 1–6.
- [16] C. Formighieri, A. Melis, *Planta* **2014**, 240, 309–324.
- [17] B. Blasi, L. Peca, I. Vass, P. B. Kós, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 22, 166–169.
- [18] L. S. Busenlehner, M. A. Pennella, D. P. Giedroc, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, 27, 131–143.
- [19] Y. Xu, R. M. Alvey, P. O. Byrne, J. E. Graham, G. Shen, D. A. Bryant, **2011**, 684, 273–293.
- [20] A. Hoschek, A. Schmid, B. Bühler, *ChemCatChem* **2018**, 10, 5366–5371.
- [21] T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 19891–19897.
- [22] M. Pesic, E. Fernández-Fueyo, F. Hollmann, *ChemistrySelect* **2017**, 2, 3866–3871.
- [23] K. Mitsukura, M. Suzuki, K. Tada, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4533–4535.
- [24] S. Velikogne, V. Resch, C. Dertnig, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2018**, 10, 3236–3246.
- [25] L. Assil-Companiononi, S. Schmidt, P. Heidinger, H. Schwab, R. Kourist, *ChemSusChem*

- 2019**, 12, 2361–2365.
- [26] C. Y. Chen, K. L. Yeh, R. Aisyah, D. J. Lee, J. S. Chang, *Bioresour. Technol.* **2011**, 102, 71–81.
- [27] M. Heining, A. Sutor, S. C. Stute, C. P. Lindenberger, R. Buchholz, *J Appl Phycol* **2015**, 27, 59–66.
- [28] A. Berepiki, J. R. Gittins, C. M. Moore, T. S. Bibby, *Synth. Biol.* **2018**, 3, ysy009.
- [29] L. Nikkanen, A. Santana Sánchez, M. Ermakova, M. Rögner, L. Cournac, Y. Allahverdiyeva, *Plant J* **2020**, 103, 1460–1476.
- [30] P. Sétif, G. Shimakawa, A. Krieger-Liszkay, C. Miyake, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2020**, 1861, 148256.
- [31] Y. Allahverdiyeva, M. Ermakova, M. Eisenhut, P. Zhang, P. Richaud, M. Hagemann, L. Cournac, E.-M. Aro, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 24007–24014.
- [32] Y. Allahverdiyeva, H. Mustila, M. Ermakova, L. Bersanini, P. Richaud, G. Ajlani, N. Battchikova, L. Cournac, E. M. Aro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 4111–4116.
- [33] M. Jokel, V. Nagy, S. Z. Tóth, S. Kosourov, Y. Allahverdiyeva, *Biotechnol Biofuels* **2019**, 12.
- [34] F. Feyza Özgen, M. E. Runda, B. O. Burek, P. Wied, J. Z. Bloh, R. Kourist, S. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 3982–3987.
- [35] P. L. Gupta, S. M. Lee, H. J. Choi, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 31, 1409–1417.
- [36] H. C. Büchenschütz, V. Vidimce-Risteski, B. Eggbauer, S. Schmidt, C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, R. Kourist, *ChemCatChem* **2020**, 12, 726–730.
- [37] A. Hoschek, B. Bühler, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, 116, 1887–1900.
- [38] J. D. Bougioukou, S. Kille, A. Taglieber, M. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 3287–3305.
- [39] N. Nett, S. Duewel, A. A. Richter, S. Hoebenreich, *ChemBioChem* **2017**, 18, 685–691.
- [40] C. Li, A. Wen, B. Shen, J. Lu, Y. Huang, Y. Chang, *BMC Biotechnol.* **2011**, 11, 92.