

Lichtgetriebene Biotransformation

Cyanobakterien als nachhaltige Katalysatoren

HANNA C. GRIMM¹, ROBERT KOURIST¹

¹INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE, TU GRAZ, ÖSTERREICH

Cyanobacteria can regenerate reaction equivalents like NADPH and ferredoxin by oxygenic photosynthesis; a unique process using light as energy source and water as electron donor. NADPH and ferredoxin are required by several oxidoreductases which is a constraint in the use of these enzymes for industrial applications. Light-driven biotransformations overcome this by coupling the photosynthetic cofactor recycling to reactions catalyzed by recombinant oxidoreductases.

DOI: 10.1007/s12268-023-1986-8

© Die Autorinnen und Autoren 2023

Redoxreaktionen finden breite Anwendung in der Pharma- und Chemieindustrie, sind jedoch oft mit harschen Reaktionsbedingungen verbunden. Dem gegenüber stehen biotechnologische Redoxprozesse, in denen Reaktionen unter milden Bedingungen und mit hoher Selektivität durchgeführt werden. Viele Oxidoreduktasen benötigen für ihre Aktivität Redoxkofaktoren wie NADH und NADPH, die durch die Oxidation von Opfersubstraten wie Glukose regeneriert werden [1]. Da hierfür nur wenige Elektronen des Opfersubstrats genutzt werden, ist die Atomeffizienz des gesamten Prozesses ungünstig. Hinzu kommt die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte.

Auch in der Natur benötigen Organismen eine Energie- und Elektronenquelle, um Reduktionsäquivalente für ihren Metabolismus zu regenerieren. Vor vielen Jahrtausenden entwickelten die Vorfahren heutiger Cyanobakterien hierzu den revolutionären Prozess der oxygenen Photosynthese. Unter Bildung von Sauerstoff wird Wasser mithilfe von Lichtenergie gespalten und NADPH und ATP für die Fixierung von CO₂ regeneriert (Abb. 1).

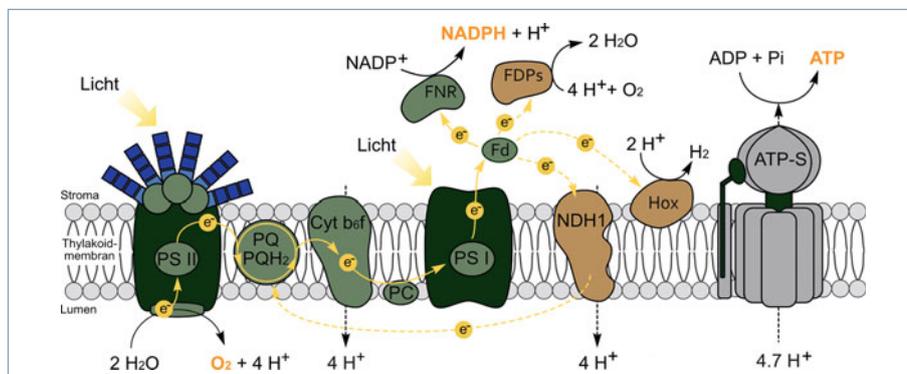
Diese lichtgetriebene Regeneration von Redoxkofaktoren in CO₂-basierten Ganzzellkatalysatoren birgt ein großes biotechnologisches Potenzial für Redoxreaktionen. Oxyfunktionalisierungen profitieren außerdem

von der intrazellulären Produktion von Sauerstoff, dessen externe Zufuhr als Oxidationsmittel durch den geringen Massentransfer zwischen Gasraum und wässriger Lösung erschwert wird [2]. Mittlerweile haben wir und andere mehrere Oxidoreduktasen rekombinant in Cyanobakterien hergestellt und die relativ hohe Produktivität der Stämme gezeigt [1]. Die bislang schnellste Reaktion ist die lichtgetriebene Reduktion aktivierter Doppelbindungen durch En-Reduktasen.

Die En-Reduktase YqjM aus *Bacillus subtilis* wurde erstmals 2016 in dem Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im weiteren *Synechocystis*) hergestellt [3]. Obwohl die spezifischen Aktivitäten (< 123 U gCDW⁻¹) und Raum-Zeit-Ausbeuten (< 1,1 g l⁻¹ h⁻¹) vergleichsweise hoch sind, konnten wir im Jahr 2020 zeigen, dass die Reaktion durch die bereitgestellte Menge an NADPH limitiert wird. Um den Elektronenfluss zu verbessern, deaktivierten wir eine konkurrierende Elektronensenke: Flavodiiron-Proteine (FDPs) stellen in der Natur einen wichtigen Schutzmechanismus dar, um den Organismus vor Überreduktion unter fluktuierenden Lichtbedingungen zu schützen. Unter kontrollierten Laborbedingungen ist ein solcher Schutzmechanismus entbehrlich, konsumiert jedoch Elektronen, die für die rekombinante Reaktion fehlen. Durch die Deaktivierung des FDPs Flv1 waren wir in der Lage, die spezifische Aktivität zu verdoppeln und eine volumetrische Produktivität von 18,3 mM h⁻¹ zu erreichen [4].

Seit der Demonstration des Konzepts hat sich das Feld weiterentwickelt. Neue Anwendungen – wie die selektive Hydroxylierung von Testosteron [5] oder die stereoselektive Bildung von α-Hydroxysäuren – wurden etabliert [6]. Forschungsschwerpunkte sind die Effizienzsteigerung sowie die Skalierung des Reaktionskonzepts.

Eine Strategie zu Effizienzsteigerung ist die Verbesserung der Genexpression in Cyanobakterien. Zum Beispiel würde ein induzierbarer Promotor eine bessere Kontrolle der Genexpression ermöglichen als die häufig verwendeten konstitutiven

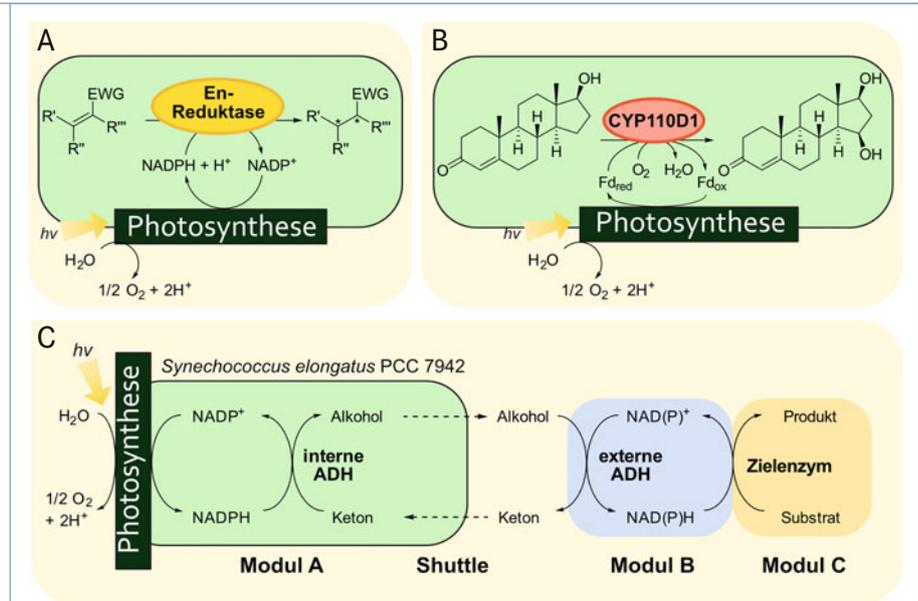


▲ Abb. 1: Schematische Darstellung der Photosynthese. Der lineare Elektronenfluss vom Photosystem II (PS II) zur Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR) ist mit gelben Pfeilen hervorgehoben. Beispiele für alternative Elektronenflüsse sind durch gestrichelte Linien dargestellt. PQ = Plastoquinon, PQH₂ = Plastoquinol, Cyt b₆f = Cytochrom-b₆f-Komplex, PC = Plastocyanin, PSI = Photosystem I, Fd = Ferredoxin, FDPs = Flavodiiron Proteine, NDH1 = NAD(P)H Dehydrogenase ähnlicher Komplex 1, Hox = bidirektionale Hydrogenase, ATP-S = ATP-Synthase.

Alternativen. Tüllinghoff *et al.* nutzten erfolgreich den Ni^{2+} -induzierbaren Promotor P_{nrsB} für die Produktion der Baeyer-Villiger-Monooxygenase (BVMO) aus *Acidovorax* sp. CHX100 und erzielten spezifische Aktivitäten bis zu $60,9 \text{ U gCDW}^{-1}$ [7]. Dies ist die bisher höchste Aktivität, die für eine lichtgetriebene Oxyfunktionalisierung erreicht wurde. Auch Art und Weise der genetischen Manipulation können Enzymproduktion und Zellaktivität beeinflussen [7]. Alternativen sind hier die Integration in das (polyploide) Genom oder die Verwendung selbstreplizierender Plasmide. Nur wenige Studien vergleichen beide Möglichkeiten. Im Fall der BVMO aus *Acidovorax* sp. erwies sich jedoch die Verwendung eines selbstreplizierbaren Plasmids als vorteilhaft.

Die Optimierung des Elektronenflusses aus unserer Studie erwies sich als vielversprechende Strategie zur Effizienzsteigerung. In einer weiteren Studie konnten wir zeigen, dass die Deaktivierung der FDPs auch die lichtgetriebene Bildung von ϵ -Caprolakton aus Cyclohexanon beschleunigt. Als Katalysator wurde eine neue BVMO aus *Burkholderia xenovorans* eingesetzt [2]. Ein Problem dieser Reaktion in *Synechocystis* ist eine Nebenreaktion. Native Alkoholdehydrogenasen (ADHs) konkurrieren um das Substrat und reduzieren es zu Cyclohexanol. Durch die beschleunigte Oxyfunktionalisierung konnten wir die Nebenreaktion ausbremsen.

Neben den FDPs besitzen Cyanobakterien noch weitere Elektronensenken, wie die bidirektionale Hydrogenase Hox. Jurkas *et al.* nutzten einen *Synechocystis*-Stamm mit deaktivierter Hox für die Produktion von α -Ketosäure-Dehydrogenasen (KADH) [6]. Der Knockout-Stamm erwies sich als robuster und tolerierte im Gegensatz zum Wildtyp die Produktion der KADHs. Es wurden Umsätze von bis zu 53 Prozent und eine ausgezeichnete Reinheit der α -Hydroxysäure erreicht. Eine weitere Elektronensenke ist der NAD(P)H-Dehydrogenase ähnliche Komplex 1 (NDH-1). Bereits 2018 deaktivierten Berepiki *et al.* die Untereinheit Ndh-D2 dieses Komplexes und erhöhten so die Aktivität einer P450-Monooxygenase [8]. Spasic *et al.* untersuchten insgesamt vier verschiedene *Synechocystis*-Stämme mit unterschiedlichen deaktivierten Elektronensenken für die lichtgetriebene Enreduktion mit YqjM [9]. Während das Ausschalten von Ndh-D2 und dem FDP Flv3 nur wenig Effekt auf die Aktivität hatte, konnte diese um 39 Prozent gesteigert werden,



▲ **Abb. 2:** Beispiele für lichtgetriebene Biotransformationen. **A,** Für Bioreduktionen wie die Reduktion von C=C-Doppelbindungen muss ausschließlich der Elektronendonator regeneriert werden [4]. **B,** Oxyfunktionalisierungen, wie die Hydroxylierung von Testosteron durch eine P450-Monooxygenase, profitieren von der intrazellulären Sauerstoffproduktion [5.] **C,** Ein modulares System koppelte die lichtgetriebene Regeneration von NADPH an ein Recyclingsystem außerhalb der Zelle [11].

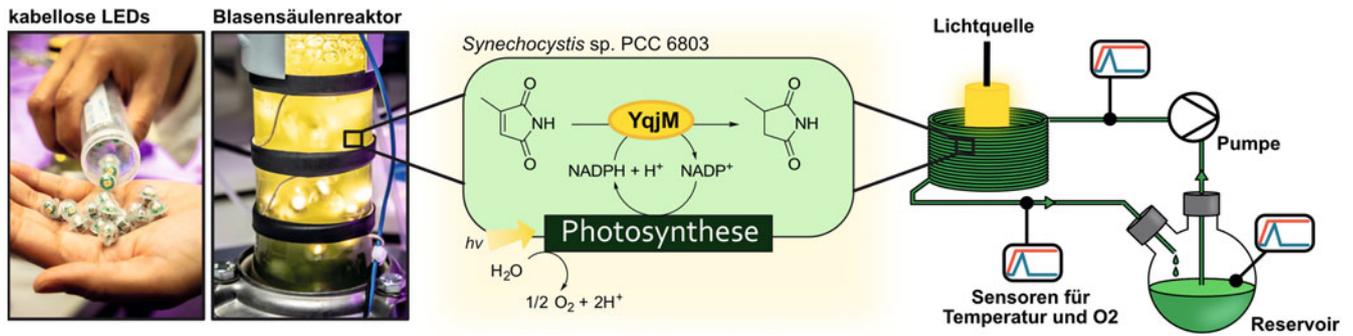
wenn Hox deaktiviert war. Ein synergistischer Effekt durch zwei deaktivierte Elektronensenken (hier Flv3 und Hox) wurde nicht beobachtet.

Durch die photosynthetische Regeneration von NADPH wird ein Protonengradient für die ATP-Bildung aufgebaut. Da NADPH durch die rekombinante Reaktion verbraucht wird, müsste sich das ADP/ATP-Verhältnis in der Zelle in Richtung ATP verschieben. Bis zu welchem Grad dies der Fall ist und wann dies für die Zelle schädlich wird, wurde bisher nicht untersucht. Auch der Einfluss glykolytischer Stoffwechselwege auf die NADPH-Regeneration ist Gegenstand aktueller Forschung. So steigerten Barone *et al.* die Aktivität der lichtgetriebenen Enreduktion durch die Zugabe von Glucose [10]. Dies beweist, dass die photosynthetische Bereitstellung von NADPH durch die Regeneration über glykolytische Stoffwechselwege unterstützt werden kann.

Kürzlich stellte die Gruppe von Wolfgang Kroutil einen alternativen Ansatz für die Nutzung von photosynthetisch regeneriertem NADPH in dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 vor [11]. Anstatt die Oxidoreduktase rekombinant in der Zelle zu produzieren, etablierten die Autoren ein modulares System, in dem ein Membranpermeabler Mediator die Elektronen zur extrazellulären Regenerierung von NAD(P)H nach außen trägt (**Abb. 2**). Eine heterolog produzierte ADH (Modul A) in dem Cyanobakterium reduzierte ein Keton unter Verbrauch von NADPH zu dem entsprechenden

Alkohol. Keton und Alkohol bildeten ein Shuttle-System und diffundierten in und aus der Zelle. Außerhalb der Zelle oxidierte eine externe ADH (Modul B) den Alkohol zurück zum Keton und regenerierte NAD(P)H. Schließlich konnte das Zielenzym (Modul C) den Kofaktor für die Reaktion nutzen. Die externe Zugabe des Zielenzym ersetz die genetische Manipulation von Cyanobakterien und in Abhängigkeit von der externen ADH lassen sich sowohl NADPH als auch NADH regenerieren. Dies erweitert die Anzahl möglicher Redoxreaktionen, was eindrucksvoll gezeigt wurde. Die Autoren zeigten (1) die Enreduktion von sechs Substraten durch 14 En-Reduktasen, (2) die Reduktion von Ketosäuren durch die zwei KADHs, (3) Reduktion von drei Iminen durch Iminreduktasen und (4) eine Oxyfunktionalisierung mithilfe einer BVMO. Bei allen Reaktionen wurden hohe Umsätze und Selektivitäten erhalten und das System erwies sich als besonders robust für Reaktionen mit giftigen Reaktionskomponenten.

Viele Studien zu lichtgetriebenen Biotransformationen arbeiten mit geringen Volumina und produzieren nur wenigen Milligramm ihrer Produkte. Um das System langfristig für industrielle Zwecke attraktiv zu machen, reichen diese Maßstäbe nicht aus. Die Skalierung von lichtgetriebenen Reaktionen ist mit verschiedenen Problemen konfrontiert. Durch die Lichtabhängigkeit des Systems lassen sich die Ganzzellbiokatalysatoren nur bis zu einer bestimmten Zelldichte aufkonzentrieren.



▲ **Abb. 3:** Strategien zur Skalierung der YqjM-katalysierten Enreduktion in *Synechocystis*. **Links:** Der Blasensäulenreaktor nutzt interne Beleuchtung über kabellose LEDs. Bilder © Lunghammer, TU Graz. **Rechts:** Bei dem Durchflussreaktor zirkuliert die Reaktionslösung durch einen dünnen, transparenten Schlauch, der um eine Lichtquelle gewickelt ist.

Selbstschattierung mindert bereits bei geringen Zelldichten ($2\text{--}3\text{ g}_{\text{CDW}}\text{ l}^{-1}$) die Effizienz der Photosynthese und führt zu einer geringeren Zellaktivität. Ein weiteres Problem ist die Akkumulation von Sauerstoff. Reaktive Sauerstoffspezies werden vermehrt gebildet, schädigen den Photosyntheseapparat und die Vitalität der Zellen [12]. Klassische Rührkesselreaktoren sind daher für lichtgetriebene Biotransformationen nicht geeignet und neue Reaktionssysteme müssen entwickelt werden (**Abb. 3**). Hoschek *et al.* immobilisierten *Synechocystis*-Zellen als Biofilm in einem Kapillarreaktor [12]. Um Sauerstoffakkumulation zu verhindern, mischten sie die Cyanobakterien mit O_2 -konsumierenden *Pseudomonas*-Zellen. Das System produzierte $3,76\text{ g m}^{-2}\text{ d}^{-1}$ Cyclohexanol und überzeugte durch seine Langzeitstabilität. Die Skalierbarkeit dieser Systeme muss jedoch noch geklärt werden, zumal die Bildung des gemischten Biofilms beträchtliche Zeit erfordert. Als potenziell skalierbares System entwickelte Heining *et al.* einen Blasensäulenreaktor (BCR) mit interner Beleuchtung durch kabellose LEDs. Diese werden über ein äußeres magnetisches Feld aktiviert [13] und in einem 200-ml-Ansatz reduzierte YqjM das prochirale Substrat 2-Methylmaleimid vollständig stereoselektiv [14]. Durch einen einzigen Extraktionsschritt konnten anschließend 630 mg reines Produkt isoliert werden. Die Skalierbarkeit dieses Systems ist durch die Höhe der Säule begrenzt. Dies betrifft zum einen die Zufuhr von CO_2 , zum anderen die Akkumulation von Sauerstoff. Die hohe volumetrische Produktivität ohne externe Zugabe von Kohlendioxid von $3,7\text{ mM h}^{-1}$ ist ein Anzeichen dafür, dass die CO_2 -Konzentration in Anwesenheit einer starken heterologen Elektronensenke nicht zwangsläufig limitierend wirkt. Die Rolle der Sauerstoffakkumulation als potenziell limitierender Faktor muss noch untersucht werden. Ein weiteres Beispiel für neue Photobioreaktoren sind kontinuierliche Systeme. Hier zirkuliert die Reaktionslösung in einem durchsichtigen Schlauch, der

um eine Lichtquelle herum aufgewickelt wurde. Durch das sehr hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen wird eine optimale Lichtverteilung gewährleistet und die Zelldichte konnte auf $4,8\text{ g l}^{-1}$ erhöht werden, ohne dass ein Aktivitätsverlust beobachtet wurde. Mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $14,4\text{ g l}^{-1}$ für die Reduktion von 2-Methylmaleimid konnte die Produktivität im Vergleich zum BCR um das 60-fache erhöht werden [15].

Zusammenfassend schreitet die Forschung zu lichtgetriebenen Biotransformationen voran und die Vielzahl an verfügbaren Modellenzymen zeigt die breite Anwendbarkeit von Cyanobakterien als Ganzzellbiokatalysatoren. Der Baukasten für die genetische Manipulation wird stetig erweitert und erste Hürden bei der Skalierung wurden genommen. Hierbei erfüllen lichtgetriebene Biotransformationen viele Kriterien für einen nachhaltigen Produktionsprozess – wie die milden Reaktionsbedingungen, die hohe Atomeffizienz der Reaktion, den CO_2 -basierten Katalysator sowie die Abhängigkeit von einer erneuerbaren Energiequelle. ■

Literatur

- [1] Malihan-Yap L, Grimm HC, Kourist R (1985) Recent advances in cyanobacterial biotransformations. *Chem Ing Tech* 11: 1628–1644
- [2] Erdem E, Malihan-Yap L, Assil Companioni L *et al.* (2022) Photobiocatalytic oxyfunctionalization with high reaction rate using a Baeyer-Villiger Monooxygenase from *Burkholderia xenovorans* in metabolically engineered cyanobacteria. *ACS Catal* 12: 66–72
- [3] Königer K, Gómez Baraibar Á, Mügge C *et al.* (2016) Recombinant cyanobacteria for the asymmetric reduction of C=C bonds fueled by the biocatalytic oxidation of water. *Angew Chem Int Ed* 55: 5582–5585
- [4] Assil Companioni L, Büchsenschütz HC, Solymosi D *et al.* (2020) Engineering of NADPH supply boosts photosynthesis-driven biotransformations. *ACS Catal* 10: 11864–11877
- [5] Mascia F, Pereira SB, Pacheco CC *et al.* (2022) Light-driven hydroxylation of testosterone by *Synechocystis* sp. PCC 6803 expressing the heterologous CYP450 monooxygenase CYP110D1. *Green Chem* 24: 6156–6167
- [6] Jurkaš V, Winkler CK, Poschenrieder S *et al.* (2022) Expression and activity of heterologous hydroxyisocaproate dehydrogenases in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ΔhoxYH . *Eng Microbiol* 2: 100008
- [7] Tüllinghoff A, Uhl MB, Nintzel FEH *et al.* (2022) Maximizing photosynthesis-driven Baeyer–Villiger oxidation efficiency in recombinant *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Catal* 1: 1–14

- [8] Bepi A, Gittins JR, Moore CM *et al.* (2018) Rational engineering of photosynthetic electron flux enhances light-powered cytochrome P450 activity. *Synth Biol* 3: ysy009
- [9] Spasic J, Oliveira P, Pacheco CC *et al.* (2022) Engineering cyanobacterial chassis for improved electron supply toward a heterologous ene-reductase. *J Biotechnol* 360: 152–159
- [10] Barone GD, Hubáček M, Malihan-Yap L *et al.* (2023) Towards the rate limit of heterologous biotechnological reactions in recombinant cyanobacteria. *Biotechnol Biofuels* Bioprod 16: 4
- [11] Jurkaš V, Weissensteiner F, De Santis P *et al.* (2022) Transmembrane shuttling of photosynthetically produced electrons to propel extracellular biocatalytic redox reactions in a modular fashion. *Angew Chem Int Ed* 134: e202207971
- [12] Hoschek A, Heuschkel I, Schmid A *et al.* (2019) Mixed-species biofilms for high-cell-density application of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in capillary reactors for continuous cyclohexane oxidation to cyclohexanol. *Bioresour Technol* 282: 171–178
- [13] Heining M, Sutor A, Stute AC *et al.* (2015) Internal illumination of photobioreactors via wireless light emitters: a proof of concept. *J Appl Phycol* 27: 59–66
- [14] Hobisch M, Spasic J, Malihan-Yap L *et al.* (2021) Internal illumination to overcome the cell density limitation in the scale-up of whole-cell photocatalysis. *ChemSusChem* 14: 3219–3225
- [15] Valotta A, Malihan-Yap L, Hinteregger K *et al.* (2022) Design and investigation of a photocatalytic setup for efficient biotransformations within recombinant cyanobacteria in continuous flow. *ChemSusChem*, 15: e202201468

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Graz University of Technology.

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>.



Hanna C. Grimm und Robert Kourist

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Robert Kourist
Institut für Molekulare Biotechnologie
TU Graz
Petersgasse 14
A-8010 Graz
kourist@tugraz.at
www.tugraz.at/institute/imbt/home