

Abschlussbericht Teilprojekt 2

# Ressourcenschonende Herstellung von Feinchemikalien

**Projektverbund BayBiotech**

Ressourcenschonende Biotechnologie in Bayern

## **Auftraggeber**

Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Rosenkavalierplatz 2, 81925 München

## **Projektnehmer**

TU München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik  
Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz  
Boltzmannstraße 15, 85748 Garching  
Tel.: +49.89.289.15712, Fax: +49.89.289.15714  
E-Mail: [d.weuster-botz@lrz.tum.de](mailto:d.weuster-botz@lrz.tum.de)  
Web: <https://www.biovt.mw.tum.de>

FAU Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik  
Prof. Dr. Kathrin Castiglione  
Paul-Gordan-Straße 3, 91052 Erlangen  
Tel.: +49.9131.85.23003, Fax: +49.9131.85.23002  
E-Mail: [kathrin.castiglione@fau.de](mailto:kathrin.castiglione@fau.de)  
Web: <https://www.bvt.tf.fau.de>

## **Berichtszeitraum:**

1. August 2015 bis 31. Oktober 2018



finanziert durch  
Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>3 Zielsetzung</b> .....	<b>6</b>
3.1 Optimierung der Cofaktorspezifität durch <i>Loop</i> -Engineering.....	6
3.2 Optimierung der Cofaktorspezifität durch Circularpermutation.....	6
3.3 Vergleich von Satzverfahren mit isolierten Enzymen und ganzen Zellen .....	6
3.4 Untersuchung verschiedener Zweiphasensysteme .....	7
3.5 Maßstabsvergrößerung .....	7
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>7</b>
4.1 Optimierung der Cofaktorspezifität durch <i>Loop</i> -Engineering.....	7
4.1.1 Planung und Ablauf.....	7
4.1.2 Ergebnisse und Diskussion .....	9
4.1.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt .....	12
4.2 Optimierung der Cofaktorspezifität durch Circularpermutation.....	13
4.2.1 Planung und Ablauf.....	14
4.2.2 Ergebnisse und Diskussion .....	14
4.2.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt .....	14
4.3 Vergleich von Satzverfahren mit isolierten Enzymen und ganzen Zellen .....	14
4.3.1 Planung und Ablauf.....	14
4.3.2 Ergebnisse und Diskussion .....	15
4.3.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt .....	19
4.4 Untersuchung verschiedener Zweiphasensysteme .....	19
4.4.1 Planung und Ablauf.....	19
4.4.2 Ergebnisse und Diskussion .....	20
4.4.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt .....	21
4.5 Maßstabsvergrößerung .....	21
4.5.1 Planung und Ablauf.....	21
4.5.2 Ergebnisse und Diskussion .....	21
4.5.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt .....	22
<b>5 Bekanntgewordene Fortschritte anderer Stellen</b> .....	<b>22</b>
<b>6 Bewertung der erzielten Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>

<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>25</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>27</b>

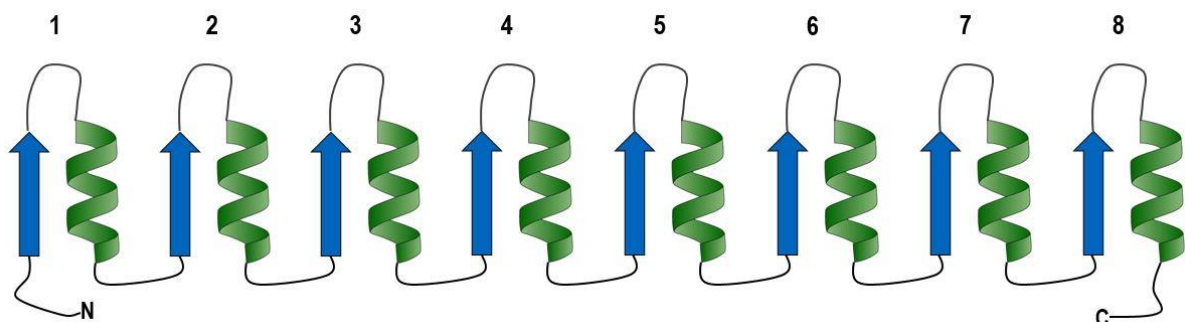
## 1 Abstract

Die asymmetrische Synthese chiraler Feinchemikalien mit Hilfe biokatalytischer Verfahren bietet ökonomische und ökologische Vorteile gegenüber klassischen chemischen Prozessen. Dabei sind Enreduktasen (ERs) in den Fokus gerückt, da sie in der Lage sind *anti*-spezifisch aktivierte C-C-Doppelbindungen zu reduzieren. ERs benötigen bei dieser Reaktion jedoch ein teures und instabiles Hilfsmolekül, das sogenannte NADPH, wodurch ihr ressourcenschonender industrieller Einsatz erschwert wird. Ziel dieses Forschungsvorhabens war daher die Akzeptanz einer ER aus einem Cyanobakterium (kurz: NostocER1) für das physiologisch verwandte Hilfsmolekül NADH, welches günstiger und stabiler als NADPH ist, zu erhöhen. Im Rahmen des Forschungsvorhabens gelang die Identifikation eines wirkungsvollen Ansatzes zur Änderung der NADH-Bindeeigenschaften. Dabei wurden die flexiblen *Loop*-Regionen der NostocER1, welche an der Bindung des NADPH beteiligt sind, durch die entsprechenden Bereiche ähnlicher ERs mit einer von Natur aus höheren Aktivität und Affinität mit NADH ersetzt. Durch die Anwendung dieser Methode konnte die Aktivität der NostocER1 um einen Faktor von  $8,5 \pm 1,1$  und die Affinität um einen Faktor von  $14,5 \pm 4,0$  gesteigert werden. Abschließend wurde die optimierte NostocER1 für die Umsetzung des industriell relevanten Substrats (R)-Carvon im Litermaßstab erfolgreich eingesetzt.

## 2 Einleitung

Chirale Verbindungen sind wichtige Bausteine für die Synthese bioaktiver Substanzen wie beispielsweise Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffe, Futtermittel und Agrochemikalien. Für die Herstellung von chiralen Molekülen ist die asymmetrische Reduktion von Alkenen äußerst interessant, da in einem Schritt bis zu zwei chirale Zentren gebildet werden können [1]. Während die *syn*-Hydrierung von Alkenen mit klassisch-chemischen Verfahren industriell etabliert ist, stellt deren *anti*-Hydrierung eine große Herausforderung für die chemische Katalyse dar und befindet sich noch im Entwicklungsstadium [2]. Hierbei wird vor allem an Verfahren geforscht, für die sehr hohe Konzentrationen weiterer Chemikalien benötigt werden. Dies macht die Entsorgung großer Mengen unerwünschter Nebenprodukte nötig, was ökologisch und ökonomisch unvorteilhaft ist.

Eine umweltfreundliche und wirtschaftlich interessante Alternative hierzu stellt die biokatalysierte Reduktion von Alkenen dar. Dabei werden die Doppelbindungen der Alkene mit Hilfe von Enreduktasen (ERs) *anti*-spezifisch hydriert. ERs aus Cyanobakterien nehmen hierbei eine herausragende Stellung ein, da sie ein breites Spektrum von Stoffen mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit und Stereoselektivität umsetzen und dabei auch Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) anstelle des instabileren und teureren Nicotinamidadenindinukleotidphosphats (NADPH) als Cofaktor nutzen können [3]. Es besteht die Vermutung, dass die Präferenz zu einem der beiden Cofaktoren entscheidend durch die *Loop*-Regionen zwischen den  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices, der in dieser Proteinklasse charakteristischen Triosephosphat-Isomerase-Fasstruktur (TIM-*Barrel*-Struktur, Abbildung 1), verantwortlich sind [4–6]. Daher kann sich eine gezielte Veränderung dieser Proteinregionen positiv auf das Bindevverhalten von NADH auswirken, wodurch ein industrieller Einsatz dieser Enzyme erheblich erleichtert werden würde. Die optimierten ERs können für die Synthese verschiedener Feinchemikalien, wie beispielsweise Dihydrocarvon, eingesetzt werden. Dihydrocarvone sind unter anderem Schlüsselbausteine in der Synthese von Antimalaria-Wirkstoffen und Naturstoffen, beispielsweise aus Moosen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente der bei ERs vorherrschenden Triosephosphat-Isomerase-Fasstruktur (TIM-*Barrel*-Struktur). Die  $\beta$ -Faltblätter (blaue Pfeile), die angrenzende *Loop*-Region und die  $\alpha$ -Helices (grüne Spirale) werden bei diesem Faltungstyp systematisch durchnummeriert, beginnend bei der N-terminalen 1 bis zur C-terminalen 8.

### 3 Zielsetzung

Im ersten Abschnitt des Projektes sollte das Verständnis der Cofaktorpräferenz bei cyanobakteriellen Enreduktasen (ERs) weiter vertieft werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte die spezifische Enzymaktivität mit NADH sowie die Affinität der ERs zu NADH als Cofaktor mittels rationaler Veränderung der Enzyme gesteigert werden. Hierdurch sollte eine mögliche umweltschonende industrielle Anwendung der ERs ermöglicht werden. Anschließend sollten die Aktivitäten der optimierten ERs bei der Reduktion des industriell relevanten Substrats (R)-Carvon bestimmt werden. Die besten Varianten des optimierten Biokatalysators sollten dann in Form von isolierten Enzymen und ganzen Zellen im Satzverfahren vergleichend gegenübergestellt werden. Der geeignetste Biokatalysator sollte abschließend für eine Maßstabsübertragung der Biotransformation in den Litermaßstab eingesetzt werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von (R)-Carvon in wässrigen Medien sollten hierbei Zweiphasensysteme verwendet werden, wobei die zweite Phase sowohl als Substratreservoir als auch als *in situ*-Produktextraktionsmittel dient.

#### 3.1 Optimierung der Cofaktorspezifität durch *Loop*-Engineering

Eine der zwei in diesem Projekt durchgeführten Strategien, um Einfluss auf die Cofaktorspezifität der ERs zu nehmen, war das sogenannte *Loop*-Engineering. Zum einen sollte hierbei eine vielversprechende Aminosäureposition (Position 130) in der *Loop* 3-Region der Enzyme gezielt verändert werden. Zum anderen sollten ganze *Loop*-Regionen der cyanobakteriellen ERs durch die entsprechenden Bereiche von NADH-akzeptierenden ERs ersetzt werden.

#### 3.2 Optimierung der Cofaktorspezifität durch Circularpermutation

Durch Circularpermutationen sollte die Flexibilität in den *Loop*-Regionen erhöht werden, um die Cofaktorspezifität zu senken. Dies bedeutet konkret eine Positionsänderung der N- und C-Termini in die entsprechende *Loop*-Region. Dabei sollte die Verknüpfung der ursprünglichen Termini sowohl mit als auch ohne *Linker*-Region erfolgen.

#### 3.3 Vergleich von Satzverfahren mit isolierten Enzymen und ganzen Zellen

Die optimierten ERs sollten für die Biotransformation des industriell relevanten Substrats (R)-Carvon im Satzverfahren mit isolierten Enzymen und mit ganzen Zellen mit überexprimierten Syntheseenzymen verwendet werden. Um eine Entscheidung fällen zu können, welches optimierte Enzym hierfür am besten geeignet ist, sollten in einem ersten Schritt die Geschwindigkeiten der Biotransformationen mit dem Cofaktor NADH und dem Substrat (R)-Carvon ermittelt werden. Anschließend sollten diese Geschwindigkeiten mit denjenigen der Biotransformation mit ganzen Zellen verglichen werden. Um die für die Biotransformation benötigten teuren Cofaktoren nicht in stoichiometrischen, sondern nur in katalytischen Mengen zugeben zu müssen, sollte ein System zur Cofaktorregeneration etabliert und in den

Vergleich implementiert werden. Dieser Aspekt war unter anderem auch im Hinblick auf eine spätere Maßstabsvergrößerung von großer Wichtigkeit.

### 3.4 Untersuchung verschiedener Zweiphasensysteme

Da das Substrat (R)-Carvon nur eine geringe Löslichkeit in Wasser zeigt, sollten bei der Bio-transformation Zweiphasensysteme zum Einsatz kommen. Die zweite Phase dient dabei sowohl als Eduktreservoir als auch als *in situ*-Produktextraktionsmittel. Hierbei sollte eine geeignete zweite Phase identifiziert werden, die das Substrat (R)-Carvon und das Produkt Dihydrocarvon in hoher Konzentration aufnehmen kann. Dabei sind die Verteilungskoeffizienten von Substrat und Produkt zwischen den beiden Phasen besonders wichtig, damit die Substratverfügbarkeit in der wässrigen Phase ausreichend und die Produktextraktion möglichst effektiv ist.

### 3.5 Maßstabsvergrößerung

In einem letzten Projektabschnitt sollte der optimierte Biokatalysator im Litermaßstab hergestellt und eingesetzt werden. Dadurch soll die mögliche Übertragbarkeit des entwickelten Bioprozesses in einen industriellen Maßstab bewiesen werden.

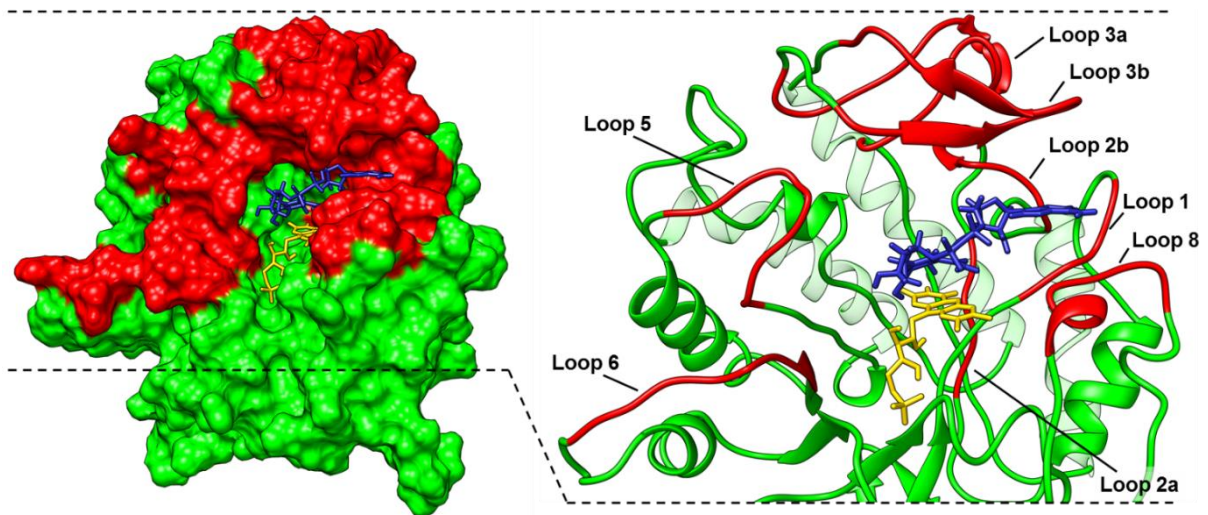
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Optimierung der Cofaktorspezifität durch *Loop*-Engineering

#### 4.1.1 Planung und Ablauf

In diesem Projektabschnitt wurden zwei Strategien des *Loop*-Engineerings angewendet. Zum einen wurde die Aminosäureposition 130 der cyanobakteriellen ERs rational verändert, zum anderen wurden gesamte *Loop*-Regionen ausgetauscht. Durch die gezielte Mutation der Position 130 konnte keine Steigerung der Aktivität mit NADH erreicht werden.

Als erfolgreicherer Ansatz, um die Bindung zu den Cofaktoren NADPH und NADH zu beeinflussen, zeigte sich der Austausch von gesamten *Loop*-Regionen. Hierzu wurde die cyanobakterielle Enreduktase 1 aus *Nostoc* sp. PCC7120 (NostocER1) als Ausgangsenzym für die Optimierung ausgewählt. Diese ER zeichnet sich durch eine hohe Regio- und Stereoselektivität bei der Umsetzung eines breiten Substratspektrums aus. Zusätzlich weist dieser Biokatalysator unter der Verwendung von NADPH als Cosubstrat vergleichsweise hohe Aktivitäten auf. Hierzu wurden die *Loop*-Regionen der NostocER1 durch die korrespondierenden Bereiche aus zwei anderen Enreduktasen ersetzt. Als Donorenzym wurde zum einen das Old Yellow Enzyme 4 aus *Achromobacter* sp. JA81 (AchrOYE4) ausgewählt. Hierbei handelt es sich um eine entfernt verwandte, proteobakterielle Enreduktase, die sich durch eine ausgesprochen hohe Affinität zu NADH auszeichnet. Als zweites Donorenzym wurde die Enreduktase 1 aus *Acaryochloris marina* (AcaryoER1) ausgewählt. Diese deutlich näher verwandte, cyanobakterielle Enreduktase, zeichnet sich durch eine hohe Aktivität mit NADH aus.



**Abbildung 2:** Homologiemodell der NostocER1 (grün) auf Grundlage der Kristallstruktur der Morphinon Reduktase (PDB ID: 2R14). Zusätzlich werden die Cosubstrate FMN (gelb) und NADH (blau), sowie die *Loop*-Regionen (rot), welche in Kontakt mit NADH stehen können, hervorgehoben.

**Links:** Darstellung der Oberfläche der Reduktase. **Rechts:** Vergrößerte, schematische Darstellung des Proteinrückgrats des aktiven Zentrums mit Beschriftung der *Loop*-Regionen.

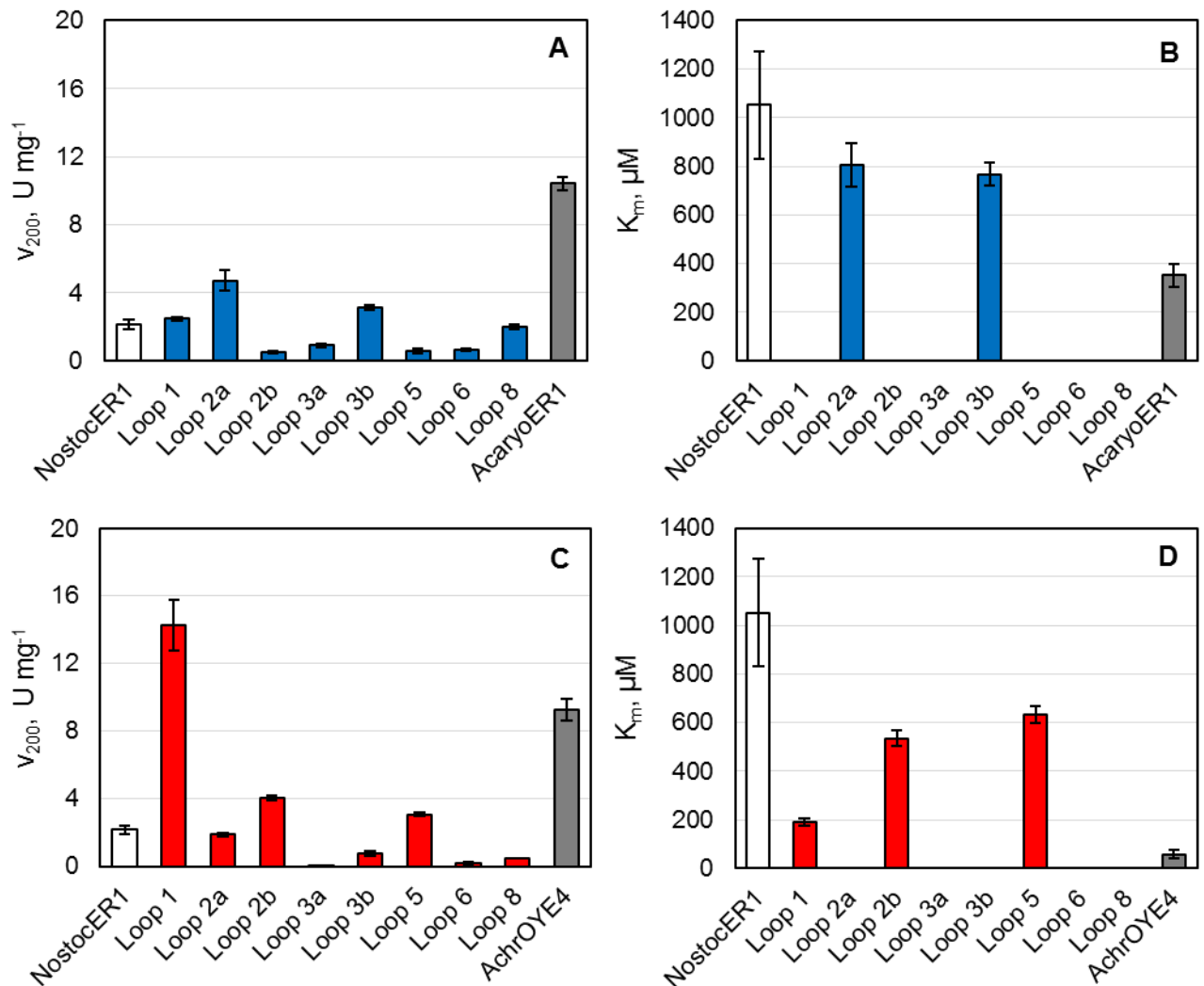
Um zu ermitteln welche *Loop*-Regionen für einen Austausch herangezogen werden sollen, wurde ein Homologiemodell der NostocER1 auf Grundlage der Kristallstruktur einer verwandten ER (Morphinon Reduktase aus *Pseudomonas putida*) erstellt. Die vermessenen Kristalle beinhalteten sowohl das Cosubstrat Flavinmononukleotid (FMN) als auch ein hydriertes NADH-Analogon (NADH<sub>4</sub>) gebunden im aktiven Zentrum. Anhand der Lage dieser Moleküle wurden FMN und NADH im NostocER1 Homologiemodell platziert. Um die finale Lage der Cosubstrate zu optimieren, wurde abschließend eine Energieminimierung des Systems mit einer Positionsbeschränkung aller Atome, mit Ausnahme der Wasserstoffatome, von 1000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> durchgeführt. In Abbildung 2 wird einerseits die Oberfläche des Biokatalysators (links) als auch eine schematische Darstellung des aktiven Zentrums (rechts) mit den gebundenen Cofaktoren FMN (gelb) und NADH (blau) dargestellt. Zusätzlich hierzu werden die *Loop*-Regionen, welche möglicherweise an der NADH-Bindung beteiligt sind, in Rot dargestellt. Dabei handelt es sich um die *Loop*-Regionen 1, 2, 3, 5, 6 und 8. Die *Loop*-Region 4 der NostocER1 ist im Vergleich zu den Bereichen der AchrOYE4 und AcaryoER1 identisch, weswegen dieser *Loop* nicht für einen Austausch berücksichtigt wurde. Aufgrund seiner Kürze und großen Entfernung zu NADH wurde *Loop* 7 nicht verändert. Da die *Loop*-Regionen 2 und 3 vergleichsweise groß sind und dadurch jeweils zwei mögliche Kontaktstellen mit NADH aufweisen, wurden diese Proteinbereiche in zwei Abschnitte unterteilt (a und b) und getrennt voneinander ausgetauscht. Die als *Loop* 8 betitelte Region beschreibt ausnahmsweise nicht den üblichen Proteinbereich zwischen  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix, sondern die Aminosäuren zwischen  $\alpha$ -Helix 8 und C-Terminus, welche sich in räumlicher Nähe zu NADH befinden.



#### 4.1.2 Ergebnisse und Diskussion

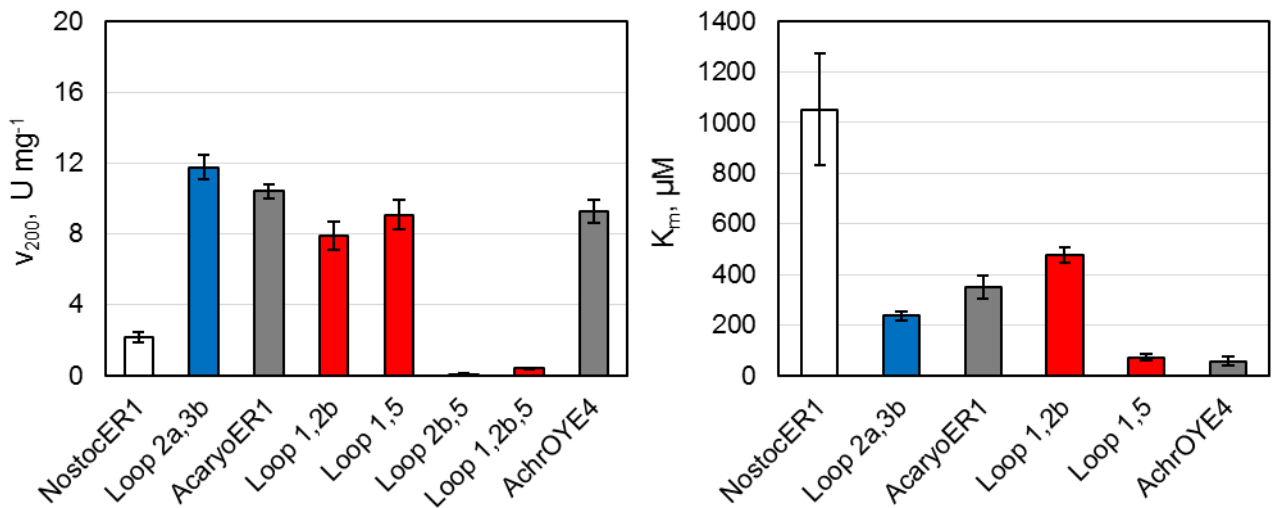
Um den Einfluss der durchgeführten *Loop*-Austausche auf das NADH-Bindevverhalten zu untersuchen, wurde die Aktivität der 16 bereitgestellten Hybridproteine bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $v_{200}$ ) NADH mindestens im biologischen Duplikat bestimmt und mit derjenigen der wildtypischen Enzyme verglichen. Darüber hinaus wurden die Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) der Hybridenzyme mit einer verglichen zur NostocER1 gesteigerten Aktivität bestimmt. Der  $K_m$  ist ein Maß für die Affinität der Enzyme zum Cosubstrat NADH. Dabei entspricht ein geringerer  $K_m$  einer wünschenswert höheren Affinität zu NADH. Die ermittelten Werte werden in Abbildung 3 dargestellt.

Im Falle der NostocER1-AcaryoER1 Hybridisierungen konnten zwei Enzyme, diejenigen mit ausgetauschtem *Loop* 2a bzw. 3b, mit einer signifikant gesteigerten Aktivität bei 200  $\mu\text{M}$  NADH identifiziert werden (Abbildung 3, A). Jedoch war weder eine Annäherung an die Aktivität der AcaryoER1, noch eine deutliche Senkung der Michaeliskonstante (Abbildung 3, B) verglichen zur NostocER1 möglich. Ein anderes Bild ergab sich jedoch durch den systematischen Austausch der NostocER1-*Loops* mit den Regionen des AchrOYE4. Hierdurch konnten drei Hybridproteine mit einer zur NostocER1 signifikant gesteigerten Aktivität generiert werden. So zeigten die ausgetauschten Regionen *Loop* 1, 2b und 5 die gewünschte Änderung der Aktivität (Abbildung 3, C). Durch diese Austausch konnte ein herausragendes Ergebnis erzielt werden. Im Falle der Substitution der *Loop* 1-Region wurde nicht nur die Aktivität der NostocER1 um Faktor  $6,1 \pm 0,9$  gesteigert, sondern sogar die Aktivität des Spenderenzym AchrOYE4 um Faktor  $1,54 \pm 0,19$  überschritten. Betrachtet man die Michaeliskonstanten dieser drei Hybridenzyme (Abbildung 3, D) wird eine signifikante Senkung des  $K_m$  verglichen zur NostocER1 deutlich. Auch hier sticht der *Loop* 1-Austausch mit einer faktoriellen Änderung von  $5,5 \pm 1,2$  und somit einem deutlich verbesserten  $K_m$  von  $190,2 \pm 14,4 \mu\text{M}$  hervor. Jedoch wurde die herausragende Affinität des AchrOYE4 zu NADH von  $57,1 \pm 17,0 \mu\text{M}$  nicht erreicht. Abschließend bleibt zu betonen, dass es bei 5 von 16 Hybridenzymen möglich war, das gewünschte Ergebnis der NADH-Aktivitätssteigerung zu erzielen beziehungsweise die Affinität zu NADH zu erhöhen.



**Abbildung 3:** **A** Aktivität der NostocER1 (weiß), der acht Hybridproteine der NostocER1 mit der entsprechenden *Loop*-Region der AcaryoER1 (blau) und der wildtypischen AcaryoER1 (grau) bei einer Cosubstratkonzentration von 200 μM ( $v_{200}$ ) NADH. **B** Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) der NostocER1 (weiß), der zwei Hybridproteine aus NostocER1 und AcaryoER1 mit einer gesteigerten NADH-Aktivität (blau) und der AcaryoER1 (grau). **C**  $v_{200}$  der NostocER1 (weiß), der acht Hybridproteine der NostocER1 mit der entsprechenden *Loop*-Region des AchrOYE4 (rot) und des AchrOYE4 (grau). **D**  $K_m$  der NostocER1 (weiß), der drei Hybridproteine aus NostocER1 und AchrOYE4 mit einer gesteigerten NADH-Aktivität (rot) und des AchrOYE4 (grau). Alle Aktivitäten wurden mindestens im biologischen Duplikat bestimmt.

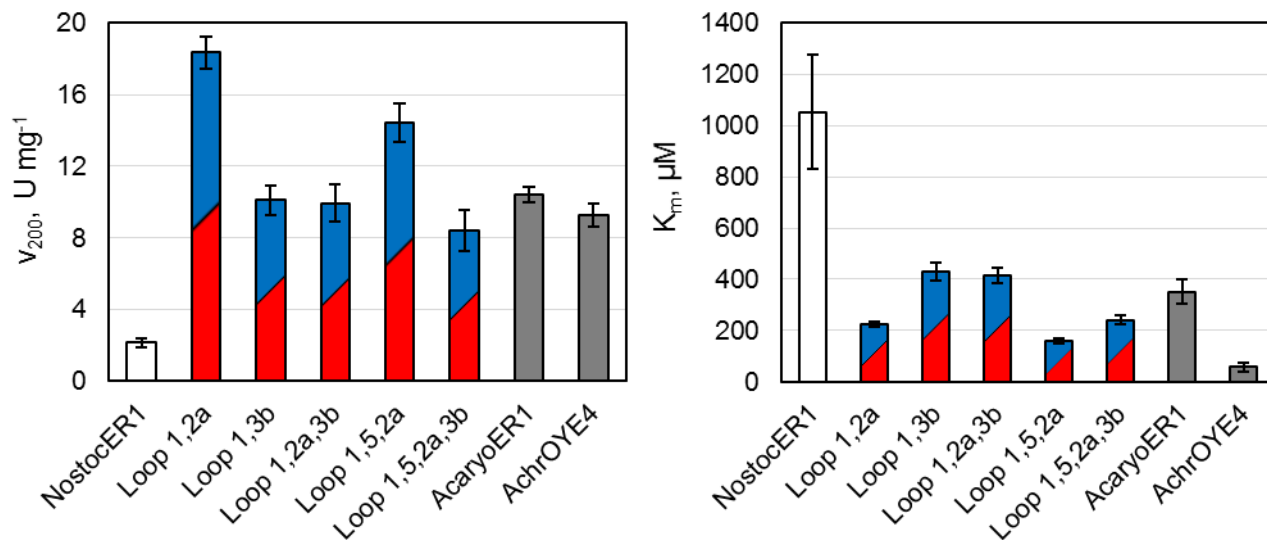
Um zu eruieren, ob eine weitere Steigerung der Aktivität mit oder Affinität zu NADH durch die Verbindung der identifizierten *Loops* möglich ist, wurden alle Kombinationsmöglichkeiten auf Seiten jedes Donorenzyms bereitgestellt. Dies bedeutet, dass vier Hybridenzyme der NostocER1 mit den AchrOYE4-*Loops* 1, 2b und 5 und ein Hybridenzym aus einer Kombination der AcaryoER1-*Loops* 2a und 3b erzeugt wurden (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Links Aktivität der NostocER1 (weiß), der Donorenzyme AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau), der AcaryoER1-Loop-Kombination 2a und 3b (blau), der Hybridproteine der NostocER1 mit den Loop-Kombinationen 1, 2b, 5 des AchrOYE4 (rot) bei einer Cosubstratkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  ( $v_{200}$ ) NADH. Rechts Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) der Loop-Kombinationen mit einer gesteigerten NADH-Aktivität im Vergleich zu den wildtypischen Enzymen.

Betrachtet man die spezifischen Aktivitäten, so ist zu erkennen, dass keine Kombination die hervorragende spezifische Aktivität der NostocER1-AchrOYE4 Loop 1 Hybridisierung übertrafen konnte. Nichtsdestotrotz war es auf Seiten beider Donorenzyme möglich durch die Kombination von je zwei Loops den entsprechenden Loop-Spender im Hinblick auf sein NADH-Bindevverhalten exakt abzubilden. So führte die Kombination der AchrOYE4 Loops 1 und 5 nicht nur zu einem  $v_{200}$  von  $9,08 \pm 0,82 \text{ U mg}^{-1}$  (AchrOYE4  $9,28 \pm 0,63 \text{ U mg}^{-1}$ ), sondern auch zu einem drastisch gesenkten  $K_m$  von  $72,6 \pm 13,2 \mu\text{M}$ . Dieser Wert ist nicht signifikant unterschiedlich zu dem  $K_m$  des AchrOYE4 ( $57,1 \pm 17,0 \mu\text{M}$ ), was ein hervorragendes Ergebnis darstellt. Analoges gilt für die Kombination der zwei AcaryoER1-Loops. Hier war es ebenfalls möglich, die spezifische Aktivität der AcaryoER1 mit  $10,42 \pm 0,41 \text{ U mg}^{-1}$  durch die Veränderung der NostocER1-Loops 2a und 3b mit  $11,77 \pm 0,68 \text{ U mg}^{-1}$  abzubilden. Bemerkenswerterweise war die Affinität dieses kombinatorischen Hybridproteins mit einem  $K_m$  von  $237,1 \pm 17,3 \mu\text{M}$  im Vergleich zur AcaryoER1 mit einem  $K_m$  von  $351,4 \pm 46,2 \mu\text{M}$  leicht erhöht.

In einem finalen Optimierungsschritt wurden Hybridisierungen der NostocER1 mit Loops bei der Donorenzyme, des AchrOYE4 und der AcaryoER1, durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Kombinationen der AchrOYE4-Loops 1 und 5 mit den Loops 2a und 3b der AcaryoER1 durchgeführt. Abbildung 5 zeigt die spezifischen Aktivitäten der Enzymvarianten bei 200  $\mu\text{M}$  NADH als Cosubstrat und die Michaeliskonstanten im Vergleich zu den wildtypischen Enzymen.



**Abbildung 5:** **Links** Spezifische Aktivität der NostocER1 (weiß), der Hybridproteine der NostocER1 mit den *Loop*-Kombinationen 1, 5 aus AchrOYE4 und 2a, 3b aus AcaryoER1 (rot/blau) und der Donorenzyme AchrOYE4 und AcaryoER1 (grau) bei einer Cosubstratkonzentration von 200 µM ( $v_{200}$ ) NADH. **Rechts** Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) der *Loop*-Kombinationen im Vergleich zu den wildtypischen Enzymen.

Erstaunlicherweise ergab keine der durchgeführten Kombinationen einen Biokatalysator, der einen geringeren  $v_{200}$  aufwies als die beiden Spender AchrOYE4 und AcaryoER1. Zusätzlich hervorzuheben ist, dass der  $K_m$  der AcaryoER1 mit  $351,4 \pm 46,2$  µM von keinem Hybridenzym signifikant überschritten wurde. Die Aktivität des *Loop* 1,2a-Hybridenzym, welches mit einer spezifischen Aktivität von  $18,35 \pm 0,88$  U mg<sup>-1</sup>, eine verglichen mit der NostocER1 um Faktor  $8,5 \pm 1,1$  gesteigerte Aktivität aufweist, verdient besondere Erwähnung. Einen ebenfalls herausragenden  $v_{200}$  zeigte die Kombination der *Loops* 1, 5 des AchrOYE4 mit der Region 2a der AcaryoER1. Dieser optimierte Biokatalysator wies eine um Faktor  $6,2 \pm 0,7$  gesteigerte Aktivität von  $14,43 \pm 1,05$  U mg<sup>-1</sup> auf. Diese beiden Hybridenzyme konnten mit Michaeliskonstanten von  $223,9 \pm 11,0$  µM bzw.  $160,7 \pm 11,4$  µM den Bereich des AchrOYE4 bzw. des *Loop* 1, 5-Hybridenzym zwar nicht erreichen, zeigen jedoch stark gesteigerte Affinitäten im Vergleich zur NostocER1.

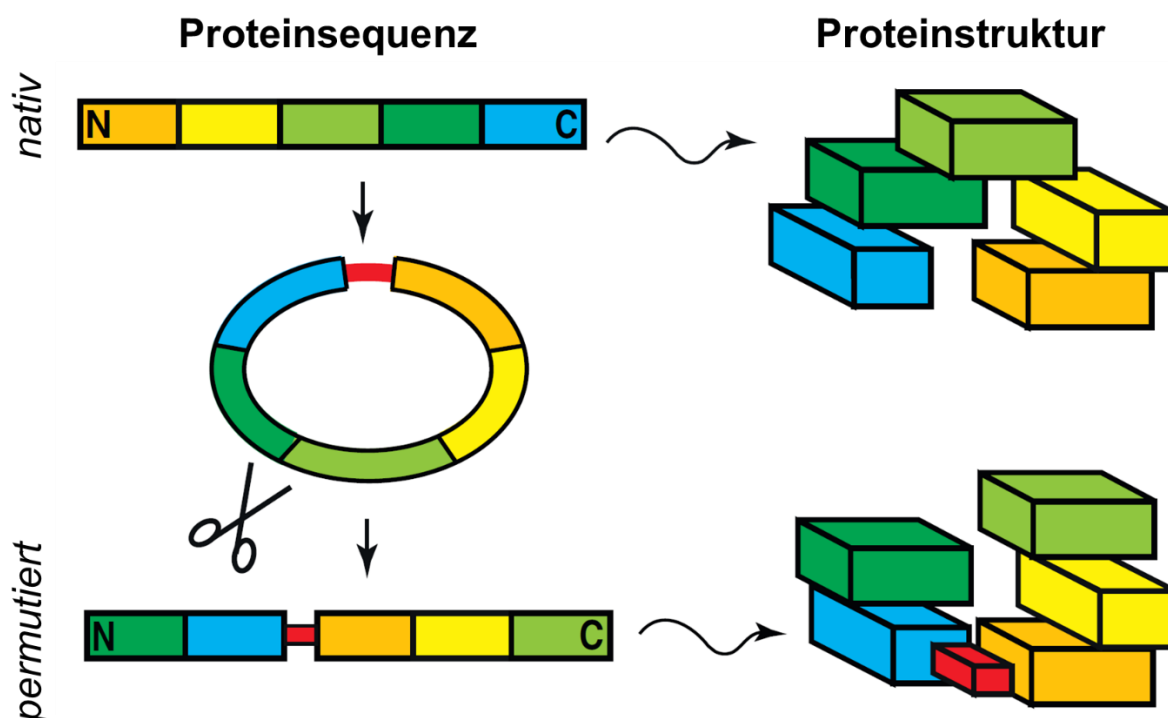
#### 4.1.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt

Die ausgesprochen guten Ergebnisse, die in diesem Projektabschnitt erzielt wurden, spiegeln das hohe Potential der angewendeten Strategie des *Loop*-Engineerings wider. Es sollte eine effiziente Möglichkeit gefunden werden, das NADH-Bindevverhalten der ERs zu beeinflussen. Dies war der essentiellste Bestandteil des Forschungsvorhabens. Aufgrund der begrenzten Anzahl erfolgreicher Beispiele in der Literatur [7] wurde dieser Projektabschnitt bereits vorab als derjenige mit der größten Herausforderung gesehen. So sind die erzielten Aktivitätssteigerungen um einen Faktor von bis zu  $8,5 \pm 1,1$  und Affinitätssteigerungen um einen Faktor von bis zu  $14,5 \pm 4,0$  als einzigartige Ergebnisse anzusehen. Bisher konnte

noch nie das Bindeverhalten einer ER zu den Cosubstraten NAD(P)H entscheidend verändert werden. Darüber hinaus gibt es kein Beispiel eines anderen Enzyms der gesamten Enzymklasse EC 1.6, der die ERs ebenfalls angehören, bei dem annähernd vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden [7]. Betrachtet man eine noch größere Enzymklasse, alle Oxidoreduktasen (EC 1), bei denen das NADH-Bindeverhalten optimiert wurde, so gibt es ausschließlich 11 Studien, bei denen ein größerer Optimierungserfolg erzielt werden konnte [7]. Noch dazu konnten diese Ziele realisiert werden, obwohl einerseits die Optimierung der Enzyme der Klasse EC 1.6 und andererseits die Optimierung von Enzymen mit prosthetischen Flavin-Gruppen, zu denen das in den ERs befindliche FMN zählt, als schwierig angesehen wird.

## 4.2 Optimierung der Cofaktorspezifität durch Circularpermutation

Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der ERs besteht in der Verlegung ihrer Termini, der sogenannten Circularpermutation (CP). Wie in Abbildung 6 abstrahiert, wird dabei die Gensequenz formal cyclisiert und an einer veränderten Position geschnitten. Hieraus kann eine zur nativen Ausgangsstruktur ähnliche Proteinstruktur gebildet werden, deren Unterschied ausschließlich in der Position der beiden Enden des Proteins liegt. Die Verknüpfung der ursprünglichen Termini kann dabei über eine *Linker*-Region (als roter Bereich dargestellt) oder direkt ohne zusätzliche Aminosäuren erfolgen.



**Abbildung 6:** Abstrahierte Darstellung der Circularpermutation (CP). Hierdurch können die Enden des Proteins (N- und C-Terminus) in einen neuen Bereich des Enzyms gelegt werden. Abbildung verändert aus [8].

#### 4.2.1 Planung und Ablauf

Als Ausgangsenzym für die CP diene ebenfalls die NostocER1. Hierfür wurde ein Grundgerüst mit je zwei aufeinanderfolgenden NostocER1-Genen hergestellt. Für die Klonierung von CPs mit einer *Linker*-Region wurde der pET28a Vektor, welcher als *Insert* die codonoptimierte NostocER1 trägt, einer \*366G-Mutation unterzogen. Da nach dem vormaligen C-Terminalen Stopcodon eine BamHI-Schnittstelle, welche für G und S codiert steht, ergibt sich eine Aufeinanderfolge von zwei Glycinen und einem Serin. Mit diesem polaren und flexiblen GGS-*Linker* wurde einer der am häufigsten verwendeten *Linker*-Typen gewählt [8]. Über die Schnittstellen BamHI und SacI wurde abschließend ein zweites Gen der NostocER1 in den Vektor eingefügt, wodurch sich ein NostocER1<sub>Copt</sub>-GGs-NostocER1-Konstrukt bereitstellen ließ. Die direkte Verknüpfung der Termini wurde mittels einer *Overlap Extension PCR* erreicht. Hierrüber wurde ein NostocER1<sub>Copt</sub>-NostocER1-Konstrukt hergestellt und über die Schnittstellen NdeI und BamHI in einen pET28a-Vektor eingefügt. Anschließend wurden die Termini genetisch in den *Loop 3*-Bereich der ER verlegt, da diese *Loop*-Region maßgeblich das aktive Zentrum der Enreduktasen verdeckt und eine Öffnung dieses Bereiches sich in einer anderen Studie bereits positiv auf die Aktivität einer genetisch verwandten Enreduktase auswirkte [9]. Abschließend wurden die CP-Varianten der NostocER1 exprimiert und ihre Aktivität mit NADH bestimmt.

#### 4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden verschiedene CPs der NostocER1 mit Termini in der *Loop 3*-Region der ER bereitgestellt. Initiale Aktivitätsbestimmungen der hergestellten modulierten Enzyme und deren Vergleich mit dem Ausgangsenzym NostocER1 ergaben eine Senkung der Aktivität von 91 % bis hin zu maximalen 98,2 % (Daten nicht gezeigt). Demnach war es nicht möglich an erfolgreich durchgeführte, aktivitätssteigernde CPs des zur NostocER1 homologen Enzyms OYE1 aus *Saccharomyces pastorianus* anzuknüpfen [9].

#### 4.2.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt

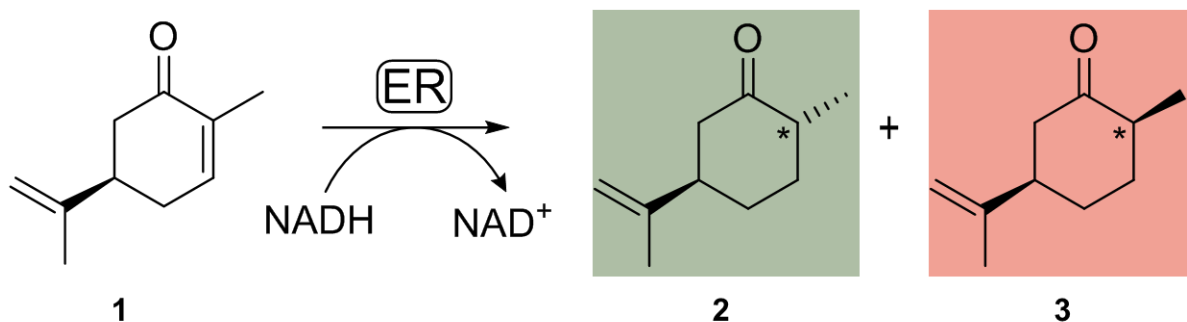
Leider war es nicht möglich durch die Bereitstellung von CPs die NostocER1 hinsichtlich ihrer NADH-Aktivität zu optimieren. Da jedoch eine funktionierende Optimierungsstrategie für die Enreduktasen ausreichend ist, um die Projektziele zu erreichen, wurde die Fokussierung der Ressourcen rechtzeitig im Projektlauf auf die funktionierende Optimierungsstrategie der *Loop*-Austausche gelegt.

### 4.3 Vergleich von Satzverfahren mit isolierten Enzymen und ganzen Zellen

#### 4.3.1 Planung und Ablauf

Im Folgenden sollten die optimierten ERs verwendet werden um (R)-Carvon (**1**) zu (2R,5R)-Dihydrocarvon (**2**) zu reduzieren. Dihydrocarvone (DHCs) besitzen industrielle Relevanz, da sie unter anderem Schlüsselbausteine in der Synthese von Antimalaria-Wirkstoffen und Naturstoffen, beispielsweise aus Moosen, sind [10]. Zusätzlich ist diese Reduktionsreaktion von

Interesse, da bisher noch keine Möglichkeit existiert nebenproduktfreies **2** herzustellen. Insbesondere die Bildung des Diastereomers (2S,5R)-DHC (**3**) soll vermieden werden, da dieses nur sehr schwer von **2** abgetrennt werden kann (Abbildung 7).

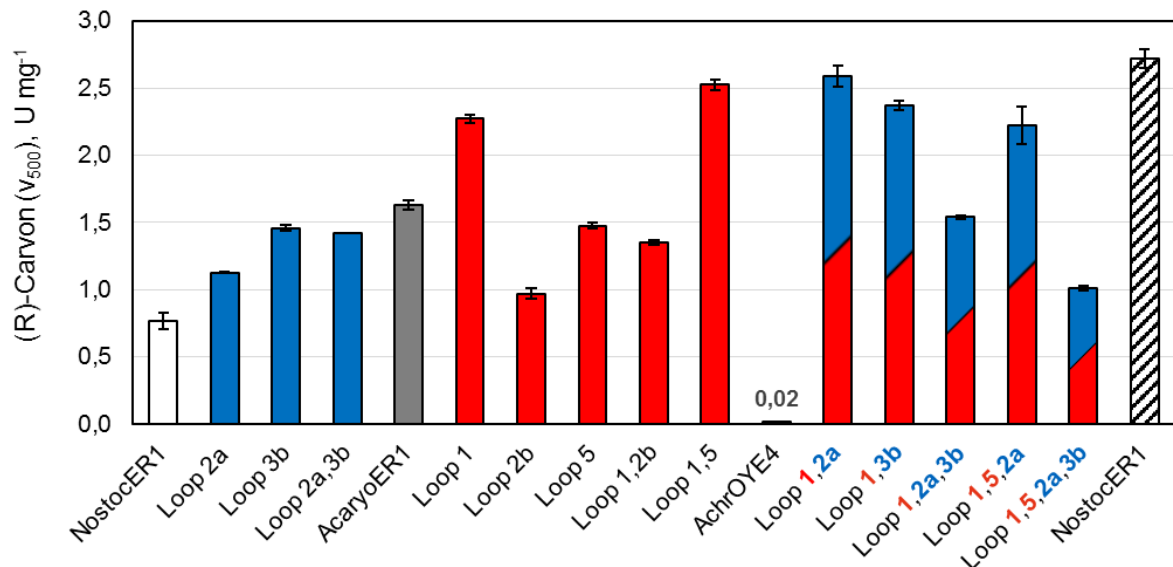


**Abbildung 7:** Angestrebte Reduktion von (R)-Carvon (**1**) zu (2R,5R)-Dihydrocarvon (**2**) unter Verwendung einer Enreduktase (ER) und NADH. (2S,5R)-Dihydrocarvon (**3**) ist dabei ein unerwünschtes Nebenprodukt, dessen Entstehung vermieden werden soll.

Um eine Entscheidungsgrundlage zu schaffen, welche NostocER1-Variante aus der Vielzahl an optimierten ERs für die Biotransformation zu **2** geeignet ist, wurden als erstes die Aktivitäten der optimierten ERs bei der Umsetzung von **1** bestimmt.

#### 4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Alle optimierten Enreduktasen, welche eine erhöhte Aktivität mit NADH als Cofaktor aufwiesen, wurden hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität bezüglich **2** charakterisiert. Hierzu wurden Aktivitätsassays mit 500  $\mu\text{M}$  NADH, 10 mM **1** bei pH 7 und 30 °C gaschromatographisch ausgewertet. Die Ergebnisse werden in Abbildung 8 aufgeführt und mit den wildtypischen Aktivitäten verglichen.

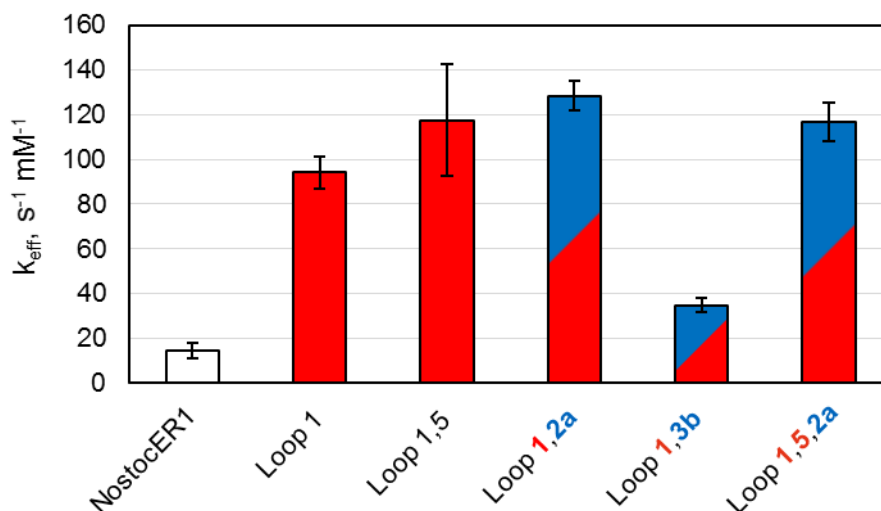


**Abbildung 8:** Spezifische Aktivität der NostocER1 (weiß), der AcaryoER1 und AchrOYE4 (grau), sowie aller optimierten NostocER1-Varianten (blau, rot, blau/rot) mit einer gesteigerten NADH-Aktivität bei der Umsetzung von (R)-Carvon (**1**). Zusätzlich wird die Aktivität der NostocER1 mit dem bevorzugten Cosubstrat NADPH dargestellt (schwarz/weiß).

Erfreulicherweise zeigen alle Varianten der NostocER1 mit einer gesteigerten NADH-Aktivität auch bei der Umsetzung des industriell relevanten **1** eine zum WT signifikant erhöhte Aktivität. Des Weiteren ist hervorzuheben, dass die schlechte Akzeptanz des AchrOYE4 für dieses Substrat trotz des Austausches mit AchrOYE4-Regionen auf keines der Hybridenzyme (rote Balken) übertragen wurde. Zusätzlich hierzu überschritten fünf Hybridenzyme die spezifische Aktivität der AcaryoER1 von  $1,63 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$ . Bei diesen fünf Hybridenzymen handelt es sich um die gleichen Enzyme, die bereits im Kontext der NADH-Aktivitätssteigerung in den Vordergrund gerückt sind. Explizit sind das die NostocER1-Varianten mit den ausgetauschten AchrOYE4-Regionen *Loop 1* und *Loop 5*, sowie deren Kombination mit den AcaryoER1-Regionen *Loop 2a* und *Loop 3b*. Diese Enzyme besitzen eine Aktivität zwischen  $2,27 \pm 0,03$  und  $2,59 \pm 0,08 \text{ U mg}^{-1}$ , was einer faktoriellen Erhöhung von bis zu  $3,4 \pm 0,3$  entspricht. Zusätzlich ist die Aktivität des NostocER1 WT mit dem natürlich bevorzugten Cosubstrat NADPH dargestellt (Abbildung 8, schwarz/weißer Balken). Mit  $2,71 \pm 0,07 \text{ U mg}^{-1}$  ist diese nicht signifikant beziehungsweise nur leicht erhöht verglichen mit den optimierten NostocER1-Varianten. Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeit mit NADH der optimierten NostocER1 auf das Maß des natürlichen Cofaktors NADPH gehoben wurde, was mit einer maximal möglichen Geschwindigkeitserhöhung der Reduktion von (R)-Carvon (**1**) gleichzusetzen ist.

Als weiteres Unterscheidungsmerkmal wurde die katalytische Effizienz ( $k_{\text{eff}}$ ) für NADH der fünf optimierten NostocER1-Varianten mit der höchsten Reduktionsgeschwindigkeit berechnet. Die katalytische Effizienz dient als zusätzliches Maß für eine gesamtheitlichere Beschreibung der Katalysatoren, da sie durch die Berechnung der Geschwindigkeit und der Affinität der Enzyme erhalten wird. Die errechneten Effizienzen dieser fünf Hybridenzyme sind in Abbildung 9 illustriert.

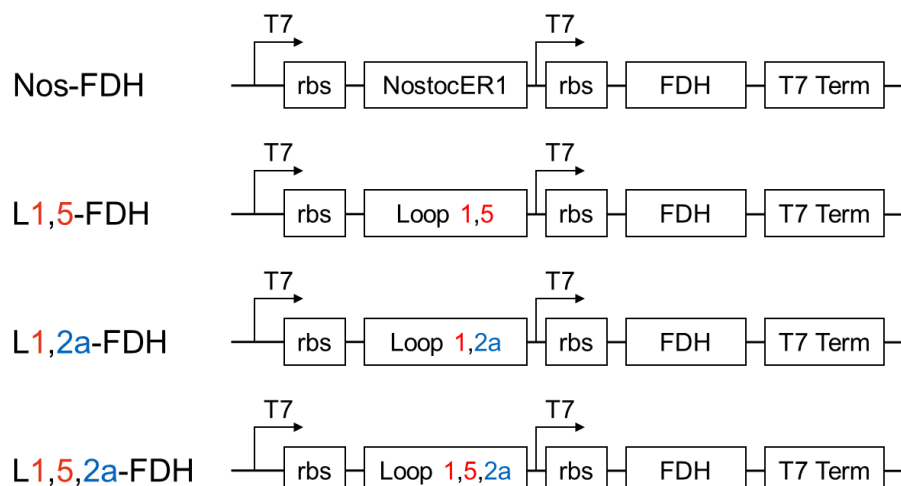




**Abbildung 9:** Katalytische Effizienz für NADH der fünf Hybridenzyme mit der höchsten (R)-Carvon (**1**) Aktivität im Vergleich zur unveränderten NostocER1 (weiß).

Vergleicht man die  $k_{\text{eff}}$  der Hybridenzyme mit derjenigen der NostocER1 so ist zu erkennen, dass alle optimierten Enzyme eine deutlich gesteigerte Effizienz aufweisen. Diese konnte im Falle der *Loop 1,2a* Hybridisierung bis zu einem Faktor von  $9,0 \pm 2,3$  auf  $128,3 \pm 6,6 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$  gesteigert werden. Hierdurch wird erneut der große Erfolg, der im Rahmen der NostocER1-Optimierung erzielt wurde unterstrichen. Des Weiteren ist kein signifikanter Unterschied der drei Hybridenzyme *Loop 1,5*, *Loop 1,2a* und *Loop 1,5,2a* zu erkennen. Da diese drei Enzyme die höchsten katalytischen Effizienzen mit NADH und zeitgleich die höchsten Aktivitäten mit (R)-Carvon (**1**) aufweisen, wurden sie für den Einsatz zur weiteren Produktion von (2R,5R)-DHC (**2**) ausgewählt.

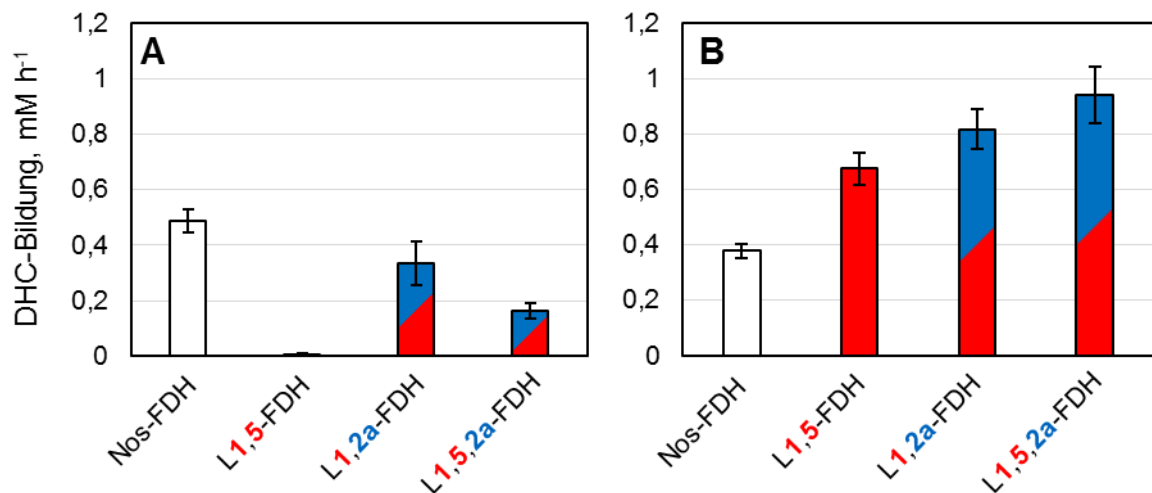
In einem letzten vorbereiteten Schritt musste der NostocER1 ein System der Cofaktorregeneration beigefügt werden. Da NADH zu teuer ist, um es in stöchiometrischen Mengen zuzugeben, wäre eine Zugabe von katalytischen Mengen NAD(H) bei der Biotransformation von ökologischem und ökonomischem Vorteil. Hierfür sollten die verschiedenen NostocER1-Varianten mit einer für diese Anforderung optimierten Formiatdehydrogenase (FDH) coexpressiert werden. Die FDH katalysiert die Oxidation von Formiat und reduziert dabei  $\text{NAD}^+$  zu NADH, welches dann wiederum von der NostocER1 verwendet werden kann. Dazu wurde der für die Expression der NostocER1(-Varianten) bereits verwendete pET28a-Vektor um einen T7 Promotor (T7), eine Ribosomen Bindestelle (rbs) und das Gen der FDH erweitert [11]. Ausschnitte der konstruierten Vektoren sind in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Für die Coexpression der NostocER1 bzw. der optimierten Varianten und der Formiatdehydrogenase (FDH) konstruierte pET28a Vektoren mit den dafür eingeführten Abkürzungen.

Um die drei Hybridenzyme miteinander und mit der wildtypischen NostocER1 zu vergleichen, wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit diesen Konstrukten transformiert und die jeweilige NostocER1-Variante mit der FDH coexprimiert. Anschließend wurden die verschiedenen Biokatalysatoren für die Produktion von (2R,5R)-DHC (**2**) herangezogen. Dafür wurden sie mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer gewaschen und einerseits direkt in Form von ganzen Zellen verwendet und andererseits mittels Ultraschall homogenisiert, zentrifugiert und als geklärte Lysate eingesetzt. Hierdurch war es möglich, die Geschwindigkeiten der Bildung von **2** zu ermitteln (Abbildung 11). Dabei ist in **A** die Geschwindigkeit der DHC-Bildung durch den Einsatz von ganzen Zellen dargestellt und in **B** die Geschwindigkeit durch die Verwendung der geklärten Lysate.

Bei der Umsetzung von 2 mM **1** konnte durch den Einsatz der NostocER1-FDH Ganzzellbiokatalysatoren eine DHC-Bildungsrate von  $0,49 \pm 0,04 \text{ mM h}^{-1}$  erzielt werden (Abbildung 11, A). Im Vergleich dazu zeigte keine der optimierten Varianten der NostocER1 eine gesteigerte Rate. Da die Geschwindigkeit der DHC-Produktion nicht erhöht werden konnte, scheidet der Einsatz von ganzen Zellen für die Maßstabsvergrößerung der DHC-Produktion aus. Ein erfreulicheres Bild zeigt hingegen durch den Einsatz der geklärten Lysate. Durch die Zugabe einer katalytischen Menge  $\text{NAD}^+$  ( $200 \mu\text{M}$ ) war es möglich die Geschwindigkeit der Umsetzung von 2 mM **1** zu erhöhen. Dabei zeigte das Ausgangskonstrukt NostocER1-FDH mit  $0,38 \pm 0,03 \text{ mM h}^{-1}$  eine zu den ganzen Zellen quasi unveränderte DHC-Bildung. Diese wurde durch die Verwendung optimierter NostocER1-Varianten auf eine Rate von  $0,68 \pm 0,06 \text{ mM h}^{-1}$  (L1,5-FDH) bis  $0,94 \pm 0,10 \text{ mM h}^{-1}$  (L1,5,2a-FDH) erhöht. Das bedeutet die DHC-Bildung konnte durch die Verwendung von L1,5,2a-FDH als geklärtes Lysat um den Faktor  $1,92 \pm 0,26$  verglichen zum Ganzzellbiokatalysator NostocER1-FDH gesteigert werden.



**Abbildung 11:** Geschwindigkeit der Biotransformation von (R)-Carvon (**1**) zu (2R,5R)-DHC (**2**) mit *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit coexprimierter NostocER1 (weiß, Nos-FDH) bzw. den drei optimierten NostocER1-Varianten (rot, rot/blau) und Formiatdehydrogenase (FDH). Dabei wurden ganzen Zellen (**A**) und geklärte Lysate (**B**) eingesetzt.

#### 4.3.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt

Durch die Optimierung des NADH-Bindevhaltens der NostocER1 war es möglich die Geschwindigkeit der Enzyme bei der Reduktion von (R)-Carvon und somit der Produktion von (2R,5R)-DHC zu erhöhen. Des Weiteren konnten für diese Anforderung die besten NostocER1-Varianten identifiziert werden. Diese waren drei Kombinationen der *Loop*-Austausche mit den AchrOYE4-Regionen 1 und 5, sowie der AcaryoER1-Region 2a. Die drei optimierten Enzyme wurden erfolgreich mit einem für die Cofaktorregeneration benötigtem Enzym (Formiatdehydrogenase, FDH) coexprimiert und für die Reduktion von 2mM (R)-Carvon eingesetzt. Dabei zeigte sich der Einsatz ganzer Zellen als nicht förderlich, der von geklärten Lysaten hingegen schon. Die größte Erhöhung der DHC-Bildungsrate war hierbei mit dem Konstrukt L1,5,2a-FDH um einen Faktor von  $1,92 \pm 0,26$  verglichen zum Konstrukt mit der unveränderten NostocER1 zu beobachten. Aus diesem Grund sollte die NostocER1 mit den ausgetauschten AchrOYE4 *Loop*-Regionen 1 und 5, sowie der AcaryoER1-Region 2a und coexprimierter FDH für die Maßstabsvergrößerte DHC-Produktion herangezogen werden.

## 4.4 Untersuchung verschiedener Zweiphasensysteme

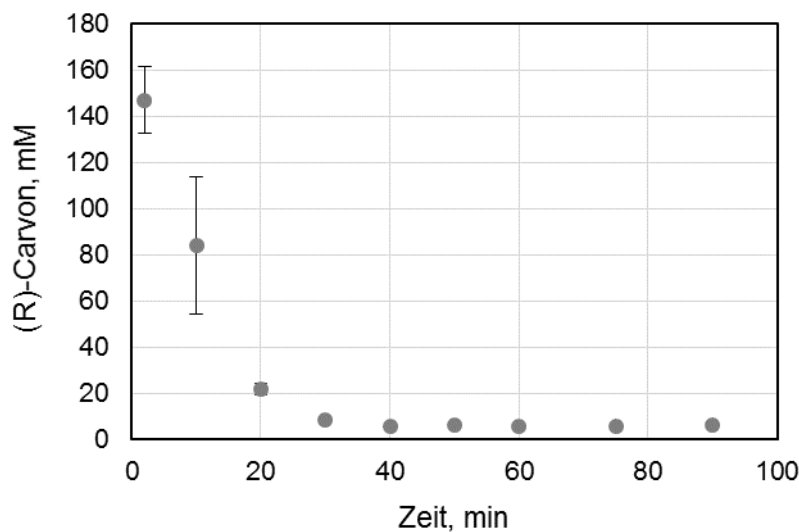
### 4.4.1 Planung und Ablauf

Da sowohl das Substrat (R)-Carvon, als auch das Produkt (2R,5R)-Dihydrocarvon eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweisen, kann eine maßstabsvergrößerte Umsetzung nicht sinnvoll in einem einphasigen, wässrigen System durchgeführt werden. Hinzu kommen toxische Effekte, die beide Substanzen auf die Enzyme auswirken. Aus diesem Grund sollte die Maßstabsvergrößerung in einem zweiphasigen Reaktionssystem durchgeführt werden. Die

zweite Phase dient dabei als Eduktreservoir, um den Einsatz größerer (R)-Carvonmengen zu ermöglichen und als *in situ*-Produktextraktionsmittel. Hierbei war der Einsatz von flüssig-flüssig und fest-flüssig Extraktionsmitteln geplant. Im Falle der flüssig-flüssig Extraktion sollten klassische organische Lösemittel (OL) und ionische Flüssigkeiten (IF) untersucht werden. Beide Extraktionsmittelklassen besitzen jedoch verschiedene Nachteile. Die hohe Flüchtigkeit von OL macht eine nachhaltige Nutzung dieses Extraktionsmittels diffizil. So verursacht ihr Einsatz große Mengen chemischen Abfall, der sich in der Atmosphäre und Grundwasser wiederfindet [12]. Ein Vorteil bieten diesbezüglich ILs. Sie sind weniger volatil, wodurch ihre Wiederverwendbarkeit erleichtert wird [13]. Jedoch ist ihre Herstellung ressourcen- und kostenintensiv, was ihren nachhaltigen Einsatz erschwert sowie einen Bioprozess im Litermaßstab weniger ökonomisch gestaltet [13]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen des Projektabschnittes der Fokus auf fest-flüssig Extraktionen gelegt. Um organische Substrate in Wasser anzureichern haben sich Adsorberharze (AHs) als äußerst funktional erwiesen. Diese AHs sind kleine Polymerkugeln, die eine große spezifische Oberfläche besitzen und in der Lage sind mit unpolaren Stoffen wechselzuwirken. Als Feststoffe sind sie durch Filtration leicht von der Flüssigphase trennbar und durch ihre Robustheit wiederverwendbar [14]. Besonders sogenannte XAD AHs sind durch ihre günstige Produktion und hervorragenden Bindeeigenschaften beliebte Festphasen [14]. Im Kontext dieser Arbeit wurde das AH XAD4 verwendet, da es bereits für die Bindung von (R)-Carvon- und Dihydrocarvon erfolgreich eingesetzt wurde [11].

### 4.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund des bereits angesprochenen negativen Effektes von (R)-Carvon auf die Enzyme, muss die Konzentration dieses Stoffes möglichst gering gehalten werden. Daher ist vor einer Zugabe des Biokatalysators ein gewisser Zeitraum in dem das Substrat an das AH binden kann, die sogenannte Equilibrierung, von großer Bedeutung. Um die Prozesszeit und dadurch auch die Prozesskosten möglichst gering zu halten, wurde der zeitliche Verlauf dieser Equilibrierung aufgezeichnet (Abbildung 12). Hierzu wurde die zu (R)-Carvon dreifache Masse XAD4 vorgelegt und in 1 L Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7) suspendiert. Anschließend wurde die Equilibrierung durch die Zugabe von 450 mM (R)-Carvon gestartet. In den ersten 20 min ist ein starker Abfall von der initialen in der wässrigen Phase vorliegenden Konzentration auf  $21,7 \pm 2,7$  mM zu beobachten. Erfreulicherweise hat sich bereits nach 40 min das Gleichgewicht um eine Konzentration von  $5,8 \pm 0,4$  mM eingestellt. Somit konnte sichergestellt werden, dass eine Equilibrierung von 40 min vor der Zugabe der Enzyme ausreichend ist, um die Konzentration des für den Biokatalysator toxischen (R)-Carvons in der wässrigen Phase drastisch zu senken.



**Abbildung 12:** Zeitliche Verlauf der Konzentration von (R)-Carvon in der wässrigen Phase bei der Equilibrierung mit XAD4 und einem RC:XAD4 Verhältnis von 1:3 (w/w).

#### 4.4.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt

Aufgrund der angesprochenen umwelttechnischen Entscheidungsgrundlage und der bereits erfolgreichen Anwendung konnten Adsorberharze als geeignete zweite Phase für Umsetzung von (R)-Carvon identifiziert werden. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass (R)-Carvon ein hervorragendes Bindeverhalten für das AH XAD4 besitzt. Des Weiteren wird durch einfache Filtration das Abtrennen der Festphase ermöglicht, was ein wichtiger Aspekt für eine mögliche industrielle Anwendung des Bioprozesses ist. Von einem Vergleich verschiedener Zulaufverfahren und kontinuierlicher Prozesse wurde abgesehen, da die Verwendung von AH nur im Satzverfahren sinnvoll ist.

## 4.5 Maßstabsvergrößerung

### 4.5.1 Planung und Ablauf

In diesem letzten Projektabschnitt soll die mögliche Übertragbarkeit des entwickelten Bioprozesses in einen industriellen Maßstab gezeigt werden. Dazu soll der optimierte Biokatalysator im Litermaßstab hergestellt werden, um mit diesem Mengen von bis zu 200 g (R)-Carvon umzusetzen.

### 4.5.2 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kontext wurde das als am geeignetsten identifizierte Konstrukt L1,2a,5-FDH in einem 3 L-Ansatz im Rührkesselreaktor exprimiert. Dazu wurde ein bereits literaturbekannter Prozess für die Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* verwendet [15]. Hierdurch konnte Biokatalysator mit einer finalen Biotrockenmassekonzentration von  $60,6 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$  hergestellt werden. Der hergestellte Katalysator wurde anschließend aufgeschlossen und das geklärte

Lysat für die Umsetzung von 146,3 g (R)-Carvon eingesetzt. Nach der erfolgreichen Bio-transformation konnten 132,7 g (2R,5R)-DHC isoliert werden. Somit wurde eine maximale Ausbeute von 89,5 % erreicht.

#### 4.5.3 Stellungnahme zum Projektabschnitt

Durch die dargestellte Umsetzung der (R)-Carvon Menge konnte die Einsatzfähigkeit der optimierten Enreduktase unter Beweis gestellt werden. Nichtsdestotrotz müssen die in diesem Projektabschnitt erzielten Ergebnisse einer weiteren Validierung unterzogen werden.

## 5 Bekanntgewordene Fortschritte anderer Stellen

Es wurden keine nennenswerten Fortschritte im Rahmen der Optimierung von Enreduktasen (ERs) erzielt. Weitreichender wurde jedoch eine frei über das Internet zugängliche Applikation entwickelt, um allgemein Änderungen von Cofaktorpräferenzen der gesamten Proteinklasse der Oxidoreduktasen (zu denen die ERs gehören) zu ermöglichen [16]. Dieses von einer amerikanischen Gruppe entwickelte Programm mit dem Namen *Specificity Reversal-Structural Analysis and Library Design* (CSR-SALAD) erkennt und bewertet Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms, die für die Bindung der Cofaktoren entscheidend sein könnten. Hierfür benötigt CRS-SALAD eine Kristallstruktur oder ein Homologiemodell mit dem gebundenen Cofaktor im aktiven Zentrum. Daraufhin werden eine Vielzahl von Enzymvarianten vorgeschlagen (in der Regel zwischen 100 und 2000 Varianten), die zu einer Änderung der Cofaktorpräferenz führen sollen, ohne dabei einen erheblichen Aktivitätsverlust zu verursachen.

Die im Rahmen dieses Projektes entwickelte *Engineering*-Strategie zeigt eine schöne Alternative zu CRS-SALAD auf. Einige Nachteile dieser Applikation konnten durch den Austausch ganzer *Loop*-Regionen umgangen werden. Für die Optimierung der NostocER1 zeigte die Anwendung von CRS-SALAD die extreme Abhängigkeit des Programms von einem verlässlichen Homologiemodell bzw. einer verlässlichen Kristallstruktur. So sollte laut CRS-SALAD ausschließlich die *Loop 3*-Region der NostocER1 verändert werden, wohingegen die durchgeführten *Loop*-Austausche eine Vielzahl von geeigneten Regionen identifizieren konnten. Des Weiteren schlug CRS-SALAD dafür mehr als 150 zu untersuchende Enzymvarianten vor, im Rahmen dieses Projektes wurden initial lediglich 16 Proteinvarianten erzeugt. Demzufolge stellen die erzielten Forschungsergebnisse eine wertvolle Ergänzung zu den bereits verfügbaren Veröffentlichungen dar.

## 6 Bewertung der erzielten Ergebnisse

Die Optimierung der Enreduktasen (ERs) bildete das Herzstück dieses Forschungsvorhabens. Ein positiver Ausgang dieses Projektabschnitts war demnach von essentieller Bedeutung. Da es noch keine vergleichbare Literatur zu dieser Thematik gab, war das Forschungsvorhaben durchaus risikoreich. Umso erfreulicher sind die im Zuge der Optimierung der ERs erzielten Ergebnisse. Die bereits im Projektantrag dargestellte Methode des ‚*Loop-Engineerings*‘ zeigte ein außergewöhnlich hohes Potential für eine positive Veränderung der Enreduktase. Hierdurch konnte erstmals eine effiziente Möglichkeit gefunden werden, das

NADH-Bindevverhalten der ERs zu beeinflussen. Konkret wurde die Aktivität der NostocER1, einer ER aus einem Cyanobakterium, um einen Faktor von  $8,5 \pm 1,1$  und die Affinität um einen Faktor von  $14,5 \pm 4,0$  gesteigert. Das Bindevverhalten der NostocER1 zu den Cosubstraten NAD(P)H konnte demnach entscheidend verändert werden. Darüber hinaus gibt es kein Beispiel eines anderen Enzyms der gesamten Enzymklasse EC 1.6, der die ERs ebenfalls angehören, bei dem annähernd vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden [7]. Betrachtet man eine noch größere Enzymklasse, alle Oxidoreduktasen (EC 1), bei denen das NADH-Bindevverhalten optimiert wurde, so gibt es ausschließlich 11 Studien, bei denen ein größerer Optimierungserfolg erzielt werden konnte [7]. Noch dazu konnten diese Ziele realisiert werden, obwohl sowohl die Optimierung der Enzyme der Klasse EC 1.6, als auch die Optimierung von Enzymen mit prosthetischen Flavin-Gruppen, zu denen das in den ERs befindliche FMN zählt, als schwierig angesehen wird [7]. Ausgehend von diesem großen Optimierungserfolg konnte ebenfalls die Umsetzung der weiteren geplanten Arbeitspakete erfolgreich durchgeführt werden. Wie initial angestrebt konnte die Geschwindigkeit bei der Umsetzung des industriell relevanten Substrats (R)-Carvon erhöht werden. Dadurch konnten die optimierten ERs in einem ressourcenschonenderen Bioprozess im Satzverfahren eingesetzt werden, welcher abschließend wie geplant einer Maßstabsvergrößerung unterzogen wurde.

## 7 Zusammenfassung

Chirale Feinchemikalien sind wichtige Bausteine für die Synthese bioaktiver Substanzen wie beispielsweise Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffe, Futtermittel und Agrochemikalien. Eine attraktive Möglichkeit chirale Moleküle herzustellen, bietet die asymmetrische Reduktion von Kohlenstoff-Doppelbindungen. Dabei kommen bisher meist chemische Schwermetall-Katalysatoren zum Einsatz. Die Biokatalyse stellt hierzu eine umweltfreundliche und wirtschaftlich interessante Alternative dar. Dabei werden die Doppelbindungen mit Hilfe von Enzymen, den sogenannten Enreduktasen (ERs), reduziert. Während dieser Reaktion benötigen fast alle ERs ein sehr teures und instabiles Hilfsmolekül, den Cofaktor Nicotinamidadeninukleotidphosphat (NADPH) für den Elektronentransport. Eine physiologische und ökonomisch bevorzugte Alternative hierzu bietet das sogenannte Nicotinamidadeninukleotid (NADH). Eine ressourcenschonende industrielle Anwendung von ERs ist abhängig von der Enzymaktivität mit NADH.

Daher war das Ziel dieses Forschungsvorhabens die Aktivitätssteigerung von ERs mit dem Elektronentransportmolekül NADH. Des Weiteren sollte die Affinität der Enzyme zu diesem teuren Molekül erhöht werden. Aus diesem Grund wurde die Enreduktase 1 aus dem Cyanobakterium *Nostoc* sp. PCC7120 (NostocER1) durch verschiedene Methoden des *Protein Engineerings*, also der zielgerichteten Struktur- und Funktionsoptimierung von Enzymen, verändert. Aufgrund des effizienten Umsatzes einer Vielzahl von Substraten ist die NostocER1 ein viel versprechender Biokatalysator. Ein industrieller Einsatz wird jedoch durch seine geringe NADH-Aktivität erschwert.

Bei den Forschungsarbeiten gelang die Identifikation eines wirkungsvollen Ansatzes zur Steigerung der NADH-Aktivität dieses Biokatalysators. Dabei wurden die flexiblen *Loop*-Regionen der NostocER1, welche an der Bindung des NADH beteiligt sind, durch entsprechende Bereiche zwei ähnlicher ‚Spender‘-ERs mit einer von Natur aus höheren Aktivität mit

NADH ersetzt. Diese ‚Spender‘ waren die cyanobakterielle Enreduktase 1 aus *Acaryochloris marina* (AcaryoER1) und das Old Yellow Enzyme 4 aus *Achromobacter* sp. JA81 (AchrOYE4). Es konnten durch 16 ausgetauschte *Loops* fünf Regionen identifiziert werden, welche für eine gesteigerte Aktivität verantwortlich waren. Durch verschiedene Kombinationen dieser fünf *Loop*-Austausche wurden optimierte NostocER1-Varianten generiert, welche eine um bis zu einem Faktor von  $8,5 \pm 1,1$  gesteigerte Aktivität bei einer industriell relevanten Cofaktorkonzentration von  $200 \mu\text{M}$  NADH aufwiesen. Zusätzlich hierzu konnte die Affinität (dem neben der Aktivität zweiten, wichtigen enzymkinetischen Parameter) der NostocER1 um einen Faktor von  $14,5 \pm 4,0$  gesteigert werden.

Durch die gesteigerte NADH Aktivität und Affinität sollte die Umsetzung von (R)-Carvon zu (2R,5R)-Dihydrocarvon beschleunigt werden. Dihydrocarvone sind unter anderem Schlüsselbausteine in der Synthese von Antimalaria-Wirkstoffen und Naturstoffen, beispielsweise aus Moosen, und besitzen daher industrielle Relevanz. Die optimierten ERs zeigten in diesem Zusammenhang eine bis zu einem Faktor von  $3,4 \pm 0,3$  erhöhte Aktivität bei der Reaktion von (R)-Carvon mit NADH. Zusätzlich ist die Aktivität des Ausgangsenzyms NostocER1 mit seinem bevorzugten teuren Cofaktor NADPH bei dieser Umsetzung nicht signifikant unterschiedlich verglichen zu den besten optimierten NostocER1-Varianten mit NADH. Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeit der (R)-Carvon Umsetzung mit NADH der auf das Maß der unveränderten NostocER1 mit seinem natürlichen Cofaktor NADPH gehoben wurde.

Da in einem technischen Prozess der stöchiometrische Einsatz von NADH zu kostenintensiv wäre und  $\text{NAD}^+$  als Abfallprodukt vermieden werden soll, wurden die optimierten Enreduktasen mit einem Enzym für die Cofaktorregeneration, der Formiatdehydrogenase (FDH), kombiniert. Die FDH katalysiert die Oxidation von Formiat und reduziert dabei  $\text{NAD}^+$  zu NADH, welches dadurch rezykliert wird. Hierzu wurden zunächst die drei geeignetsten NostocER1-Varianten anhand ihrer NADH-Aktivität und -Affinität sowie der Reaktionsgeschwindigkeit mit (R)-Carvon ausgewählt. Nach einer genetischen Kombination dieser drei optimierten Enzyme und der FDH, wurde ihr Einsatz als ganze Zellen und geklärte Lysate untersucht. Hierbei zeigte sich der Einsatz der optimierten NostocER1-Varianten als ganze Zellen als nicht förderlich verglichen zum unveränderten Ausgangsenzym. Hingegen war die Geschwindigkeit der drei untersuchten optimierten Enzyme bei der Verwendung von geklärten Lysaten um einen Faktor von bis zu  $2,5 \pm 0,3$  höher als die der nicht optimierten ER. Die Kombination aus optimierter NostocER1 und FDH, die in diesem Zusammenhang die größte Geschwindigkeitssteigerung zeigte wurde für die Umsetzung von  $146,3 \text{ g}$  (R)-Carvon eingesetzt. Hierfür wurden die Enzyme zunächst durch die Kultivierung von *E. coli* im 3 L-Maßstab bereitgestellt. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und der lösliche Überstand für die Biotransformation der dieser (R)-Carvonmenge herangezogen. Da sowohl das Edukt (R)-Carvon, als auch das Produkt (2R,5R)-Dihydrocarvon schlecht löslich in Wasser sind, musste der Biotransformation eine zweite Phase beigefügt werden, die zugleich als Eduktreservoir und Produktextraktionsmittel diente. Da es ökologische und ökonomische Vorteile bietet und in diesem Kontext bereits Anwendung fand, wurde das Adsorberharz XAD4 für diesen Zweck ausgewählt, wodurch eine maßstabsvergrößerte Biotransformation ermöglicht wurde.



## 8 Ausblick

In der ersten Hälfte des Forschungsvorhabens sollte die Cofaktorspezifität der NostocER1 durch verschiedene Methoden des *Protein Engineerings* beeinflusst werden. Hierzu wurde die Aktivität und Affinität mit dem ökonomisch bevorzugten NADH gesteigert. In diesem Kontext zeigte sich der Austausch von *Loop*-Regionen als herausragende Optimierungsstrategie. Aufgrund einer Vielzahl außergewöhnlicher und in diesem Feld bislang einzigartiger Ergebnisse erscheint es sinnvoll die Optimierung der NostocER1 weiter zu entwickeln. Eine Erklärung auf molekularer Ebene der im Rahmen dieses Forschungsvorhabens erzielten Ergebnisse wäre von großem Interesse. Obwohl durch den Austausch ganzer *Loop*-Regionen größere Bereiche des Proteins geändert wurden, könnte die mit diesem Austausch einhergehende Änderung des NADH-Bindevhaltens die Folge eines einzelnen Aminosäureaustauschs sein. Eine Identifikation dieser wesentlichen Aminosäuren würde ein zusätzliches Optimierungspotential der NostocER1 liefern. Hierfür könnten Molekulardynamik (MD)-Simulationen herangezogen werden. Mit Hilfe von Hochleistungsrechnern ermöglichen MD-Simulationen eine detaillierte Beschreibung molekularer Prozesse.

Zusätzlich könnte die Übertragbarkeit der angewendeten Strategie auf andere Enreduktasen oder Enzyme weiterer Enzymklassen untersucht werden. Ob durch den Austausch von *Loop*-Regionen bei Enzymen neben der NostocER1 ebenfalls Einfluss auf die Cofaktorspezifität genommen werden kann, wäre von großem wissenschaftlichem Interesse.

## 9 Veröffentlichungen

Die in Kapitel 4.1 *Optimierung der Cofaktorspezifität durch Loop-Engineering* dargestellten Ergebnisse wurden in einem Manuskript für eine wissenschaftliche Publikation zusammengefasst. Dieses Manuskript befindet sich momentan in einem für wissenschaftliche Veröffentlichungen üblichen *peer-review* Prozess, der zeitnah abgeschlossen sein wird.

Des Weiteren konnten die im Rahmen dieses Projektes erzielten Ergebnisse auf vier renommierten internationalen Konferenzen präsentiert werden. Zum einen durch Vorträge auf der „DECHEMA Himmelfahrtstagung“ im Mai 2018 (Magdeburg, DE) und dem „9<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis“ im August 2018 (Hamburg, DE). Zum anderen durch Präsentationen wissenschaftlicher Poster auf dem „Gordon Research Seminar – Biocatalysis“ im Juli 2018 (Biddeford, US) und dem „12<sup>th</sup> European Symposium on Biochemical Engineering Science“ im September 2018 (Lissabon, PT).

## 10 Literatur

- [1] Stuermer, R., Hauer, B., Hall, M., Faber, K. (2007). Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Current Opinion in Chemical Biology* **11/2**, 203–213.
- [2] Yang, J. W., Hechavarria Fonseca, M. T., Vignola, N., List, B. (2005). Metal-Free, Organocatalytic Asymmetric Transfer Hydrogenation of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes. *Angew. Chem.* **117/1**, 110–112.
- [3] Fu, Y., Castiglione, K., Weuster-Botz, D. (2013). Comparative characterization of novel ene-reductases from cyanobacteria. *Biotechnology and bioengineering* **110/5**, 1293–1301.
- [4] van den Hemel, D., Brige, A., Savvides, S. N., van Beeumen, J. (2006). Ligand-induced Conformational Changes in the Capping Subdomain of a Bacterial Old Yellow Enzyme Homologue and Conserved Sequence Fingerprints Provide New Insights into Substrate Binding. *Journal of Biological Chemistry* **281/38**, 28152–28161.
- [5] Barna, T. M., Khan, H., Bruce, N. C., Barsukov, I., Scrutton, N. S., Moody, P. C. (2001). Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme. *Journal of molecular biology* **310/2**, 433–447.
- [6] Pudney, C. R., Hay, S., Scrutton, N. S. (2009). Bipartite recognition and conformational sampling mechanisms for hydride transfer from nicotinamide coenzyme to FMN in pentaerythritol tetranitrate reductase. *The FEBS journal* **276/17**, 4780–4789.
- [7] Chánique, A. M., Parra, L. P. (2018). Protein Engineering for Nicotinamide Coenzyme Specificity in Oxidoreductases. Attempts and Challenges. *Frontiers in microbiology* **9/194**, 1–14.
- [8] Yu, Y., Lutz, S. (2011). Circular permutation. A different way to engineer enzyme structure and function. *Trends in Biotechnology* **29/1**, 18–25.
- [9] Daugherty, A. B., Govindarajan, S., Lutz, S. (2013). Improved biocatalysts from a synthetic circular permutation library of the flavin-dependent oxidoreductase old yellow enzyme. *Journal of the American Chemical Society* **135/38**, 14425–14432.
- [10] Dong, Y., McCullough, K. J., Wittlin, S., Chollet, J., Vennerstrom, J. L. (2010). The structure and antimalarial activity of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes derived from (+)-dihydrocarvone. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20/22**, 6359–6361.
- [11] Castiglione, K., Fu, Y., Polte, I., Leupold, S., Meo, A., Weuster-Botz, D. (2017). Asymmetric whole-cell bioreduction of (R)-carvone by recombinant *Escherichia coli* with in situ substrate supply and product removal. *Biochemical Engineering Journal* **117**, 102–111.
- [12] Lipshutz, B. H., Gallou, F., Handa, S. (2016). Evolution of Solvents in Organic Chemistry. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **4/11**, 5838–5849.
- [13] Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *GSC* **04/01**, 44–53.
- [14] Daignault, S. A., Noot, D. K., Williams, D. T., Huck, P. M. (1988). A review of the use of XAD resins to concentrate organic compounds in water. *Water Research* **22/7**, 803–813.
- [15] Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Sylatak, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. (2001). High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an ex-

pression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter. *Biotechnology and bioengineering* **73**/2, 95–103.

- [16] Cahn, J. K. B., Werlang, C. A., Baumschlager, A., Brinkmann-Chen, S., Mayo, S. L., Arnold, F. H. (2017). A General Tool for Engineering the NAD/NADP Cofactor Preference of Oxidoreductases. *ACS synthetic biology* **6**/2, 326–333.

## 11 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 1:** Verwendete Abkürzungen.

Abkürzung	Begriff
AcaryoER1	Enreduktase 1 aus <i>Acaryochloris marina</i>
AchrOYE4	Old Yellow Enzyme 4 aus <i>Achromobacter</i> sp. JA81
AH	Adsorberharz
DHC	Dihydrocarvon
FDH	Formiatdehydrogenase
IF	Ionische Flüssigkeit
L	<i>Loop</i> , flexible Proteinregion zwischen $\beta$ -Faltblatt und $\alpha$ -Helix der Enreduktasen
NADH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NostocER1	Enreduktase 1 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC7120
OL	Organisches Lösemittel
RC	(R)-Carvon
U	Unit, Einheit der katalytischen Aktivität in $\mu\text{mol min}^{-1}$
$v_{\text{xxx}}$	Enzymaktivität bei einer Cofaktorkonzentrationen von xxx $\mu\text{M}$ NAD(P)H
WT	Wildtyp