



Rekombinante Cyanobakterien für die asymmetrische Reduktion von C=C-Bindungen mithilfe biokatalytischer Wasseroxidation

Katharina Königer, Álvaro Gómez Baraibar, Carolin Mügge, Caroline E. Paul, Frank Hollmann, Marc M. Nowaczyk und Robert Kourist*

Abstract: Eine in Cyanobakterien exprimierte, rekombinante Enoat-Reduktase wurde für die lichtkatalysierte, enantioselektive Reduktion von C=C-Bindungen genutzt. Dabei ermöglicht die Kopplung von Oxidoreduktasen an die natürliche Photosynthese eine durch Wasseroxidation angetriebene asymmetrische Synthese. Durch den Verzicht auf zusätzliche Cosubstrate als Elektronendonoren wird die Bildung unerwünschter Nebenprodukte gemindert und die Atomökonomie der Reaktion erhöht. Die Verfügbarkeit von NADPH und die Menge an aktivem Enzym in der Zelle sind entscheidende Faktoren für die Produktbildung. Die Effizienz der Reaktion ist mit derjenigen typischer Ganzzell-Biotransformationen in *E. coli* vergleichbar: Unter optimierten Bedingungen wurden 100 mg prochirales 2-Methylmaleimid zu enantiomerenreinem 2-Methylsuccinimid (99 % ee, 80 % Ausbeute an isoliertem Produkt) reduziert. Die hohen Produktausbeuten und die exzellente Enantiomerenreinheit durch den Einsatz rekombinanter Cyanobakterien in einer lichtgetriebenen Ganzzell-Biotransformation ergeben einen einfachen und allgemein anwendbaren Syntheseansatz.

Die katalytische Reduktion von C=C-Doppelbindungen ist eine der wichtigsten Redoxreaktionen in der organischen Chemie.^[1] Dabei bietet der Einsatz von Oxidoreduktasen (d.h. von Enzymen, die Redoxreaktionen katalysieren) besonders während hochselektiver Transformationen eine Alternative zu etablierten chemischen Redox-Katalysatoren.^[2] Eine Ergänzung zu chemischen Katalysatoren bilden Enoat-Reduktasen (ER), die hochselektiv die *trans*-Hydrierung an (konjugierten) C=C-Doppelbindungen katalysieren.^[3] Ein Defizit der enzymatischen Enoatreduktion ist allerdings ihre begrenzte Umweltverträglichkeit. Die chemische Reduktion von C=C-Bindungen durch Hydrierung (d.h. Addition von H₂ unter Metallkatalyse) geschieht in perfekter Atomökonomie. ER-katalysierte Reduktionen hingegen benötigen stöchio-

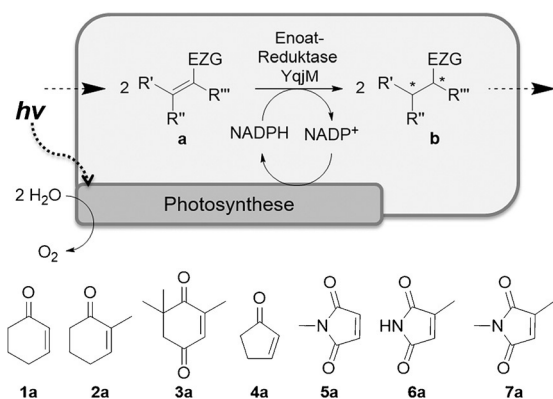
metrische Mengen an Reduktionsmitteln, wie Glukose, Formiat oder 2-Propanol, deren Reduktionsäquivalente indirekt durch reduzierte Nikotinamid-Cofaktoren an die Enzyme übertragen werden. Dementsprechend sind ER-katalysierte Reaktionen nicht als atomökonomisch anzusehen, da während der Reduktion ein erheblicher Teil an Nebenprodukten (Glukonolacton, CO₂ oder Aceton) entsteht.^[4] Der Einsatz von Wasser als stöchiometrisches Reduktionsmittel würde die Atomeffizienz erheblich verbessern. Während erste Arbeiten zum Antrieb von Biotransformationen durch Wasseroxidation mithilfe anorganischer Katalysatoren sehr vielversprechende Ergebnisse lieferten,^[5] bietet der natürliche Prozess der Photosynthese ein hochoptimiertes natürliches System,^[6] das an der Bildung eines Großteils der Biomasse auf dem Planeten beteiligt ist. Die Verbindung enzymatischer Redoxprozesse mit dem Photosystem in Cyanobakterien würde dabei den Einsatz von zusätzlichen organischen Elektronendonoren und teuren Redox-Mediatoren überflüssig machen. Zusätzlich bieten lichtgetriebene Ganzzell-Biokatalysen die üblichen Vorteile mikrobieller Biotransformationen, wie die In-situ-Produktion von Biokatalysator und Cofaktoren. Außerdem ist der Prozess der Photosynthese besonders effektiv für die Regeneration von NADPH, das in heterotrophen Organismen schwieriger bereitzustellen ist.

Endogene Enzyme aus Cyanobakterien wurden bereits für Biotransformationen, wie die Funktionalisierung von Monoterpenen^[7] und die Synthese chiraler Phosphonate, verwendet.^[8] Wildtyp-Organismen bieten jedoch nur ein begrenztes Optimierungspotenzial. Gleichzeitig vereinfacht der große Fortschritt bei genetischen Manipulationsmethoden von Cyanobakterien die Erzeugung rekombinanter Stämme.^[9] Genetisch manipulierte Cyanobakterien bieten das Potenzial, vielfältige Biotransformationen mit unterschiedlichen Klassen an Oxidoreduktasen durchzuführen. Cyanobakterien sind darüber hinaus leichter zu manipulieren als komplexere photoautotrophe Grünalgen oder Pflanzen. Wir konnten bereits zeigen, dass Biokatalysatoren effizient in Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 exprimiert werden konnten und deren Zellbestandteile die Durchführung enantioselektiver Transformationen nicht beeinträchtigen.^[10] Cyanobakterien enthalten bis zu 200 Kopien ihres Genoms, sodass ein Gen leicht in hoher Kopienzahl in die Zelle integriert werden kann.^[9] Diese Arbeit zeigt anhand der enantioselektiven Reduktion von C=C-Doppelbindungen die Machbarkeit von photosynthetisch getriebenen Biotransformationen durch rekombinante Cyanobakterien. Die Expression der NADPH-abhängigen Enoat-Reduktase YqjM aus *Bacillus subtilis*^[11] in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ermöglichte

[*] K. Königer, Dr. Á. Gómez Baraibar, Dr. C. Mügge, Prof. Dr. R. Kourist
Nachwuchsgruppe Mikrobielle Biotechnologie
Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)
E-Mail: Robert.Kourist@rub.de

Dr. M. M. Nowaczyk
Lehrstuhl Biochemie der Pflanzen
Ruhr-Universität Bochum (Deutschland)
Dr. C. E. Paul, Dr. F. Hollmann
Department of Biotechnology
Delft University of Technology (Niederlande)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) der Autoren sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601200> zu finden.



Schema 1. Lichtgetriebene Reduktion von Alkenen mit der ER YqjM durch photosynthetische Cofaktor-Regeneration in ruhenden Zellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803. EZG = elektronenziehende Gruppe.

die Reduktion verschiedener Modellsubstrate **1a–7a** (Schema 1).

Das Gen der Enat-Reduktase wurde aus genomischer DNA von *B. subtilis* über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und unter der Kontrolle des lichtinduzierten Promotors psbA2 in das Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 integriert. Dieser Promotor ermöglicht eine hohe Expression und wird durch hohe Lichtintensität induziert.^[10] Cyanobakterien mit exprimierter ER YqjM zeigten einen vielversprechenden Umsatz bei der Reduktion von 2-Methyl-*N*-Methylmaleimid (**7a**) zu (*R*)-2-Methyl-*N*-Methylsuccinimid **7b** (Abbildung 1a). Aus den Daten geht eine eindeutige positive Korrelation zwischen Zelldichte und Umsatz hervor. Kontrollexperimente mit *Synechocystis*-Zellen ohne rekombinantes Gen zeigten keinen messbaren Umsatz (Daten nicht

gezeigt). Die hohe Enantiomerenreinheit des gebildeten **7b** (>99% *ee* in allen Experimenten) ist ein zusätzlicher Indikator dafür, dass die Reaktion durch die exprimierte ER katalysiert wird. Die Zellen waren während einer Reaktionszeit von 24 h lebensfähig. Danach führte eine höhere eingestrahlte Lichtintensität von 300 μE zu einer deutlichen Abnahme an lebensfähigen Zellen der Mutanten mit exprimierter YqjM gegenüber dem Wildtyp. Da *Synechocystis* bei mittleren Lichtintensitäten von 150 μE proliferiert, können von Lichtinduktion^[8] unabhängige Strategien der Enzymexpression in Cyanobakterien diese Einschränkung umgehen. Der Umsatz von **7a** unter Einfluss von sichtbarem Licht mit einer Intensität von 150 μE war signifikant größer als ohne Licht, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der asymmetrischen Synthese von **7b** tatsächlich um einen lichtabhängigen Prozess handelt (Abbildung 1b). Durch die Zugabe des Photosyntheseinhibitors 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) wurde die Produktbildungsrate um ca. 50% gesenkt, aber nicht vollständig unterdrückt. Auch unter Lichtausschluss wurde Produktbildung beobachtet, wenn auch mit ähnlicher, deutlich verringerter Produktbildungsrate. Wir schreiben diese Beobachtung der Bildung von Kohlenhydraten während der Wachstumsphase der Cyanobakterien zu, die unter Mangelbedingungen abgebaut werden können, um NAD(P)H zu regenerieren. Um den genauen zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären, werden weitere Untersuchungen notwendig sein.

Nichtsdestotrotz ermöglicht dieses System einen vollen Umsatz ohne die Zugabe zusätzlicher Cofaktoren oder Co-substrate. Ähnliche Anfangsgeschwindigkeiten der Produktbildungsrate bei unterschiedlichen Konzentrationen von **7a** lassen auf eine Sättigung des Ganzzell-Katalysators schließen, bis die abnehmende Substratkonzentration die Produktbildung verlangsamt (Abbildung 2a).

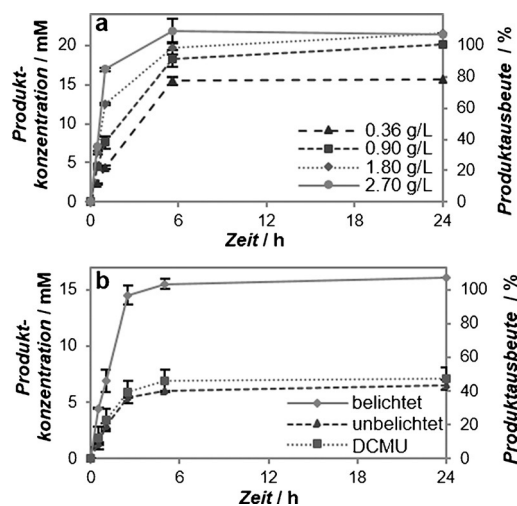


Abbildung 1. Bildung von **7b** durch asymmetrische Reduktion von **7a**, katalysiert durch die in *Synechocystis* sp. PCC 6803 exprimierte ER YqjM. a) Verschiedene Zelldichten (in g L^{-1} Zelltrockenmasse). Substratkonzentration: 20 mM. b) Umsatz von **7a** unter Belichtung mit einer Lichtintensität von 150 μE , Dunkelheit und lichtexponierten Bedingungen unter Einfluss des Photosyntheseinhibitors DCMU mit einer Substratkonzentration von 15 mM und 1% Ethanol (v/v). In allen Proben betrug die Enantiomerenreinheit des gebildeten **7b** >99% *ee*.

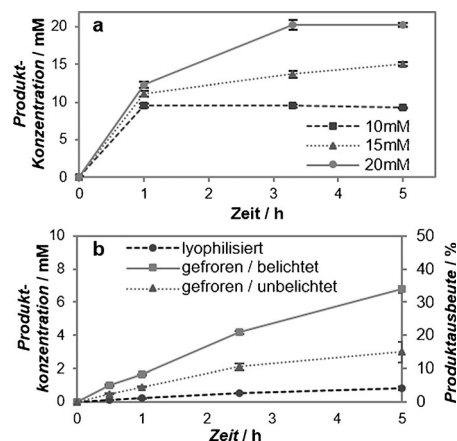


Abbildung 2. a) Reduktion von **7a** bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Zelldichte: 1.8 $\text{g}_{\text{cdw}} \text{L}^{-1}$. b) Stabilität der Zellen bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff und siebentägiger Aufbewahrung bei -20°C zeigten Cyanobakterien (1.8 g L^{-1}) Aktivität gegenüber Substrat **7a** (20 mM). Die Produktbildungsrate unter Lichteinfluss (\blacksquare) war höher als die ohne Bestrahlung (\blacktriangle), was darauf schließen lässt, dass die Zellen weiter zur Photosynthese befähigt waren.

Um die Robustheit des Systems zu testen, wurden die Cyanobakterien in flüssigem Stickstoff bei -20°C sieben Tage aufbewahrt. Nach dem Auftauen katalysierten diese Zellen die Reduktion von **7a** stereoselektiv mit einer Produktbildungsrate von 1.6 mm h^{-1} (Abbildung 2b). Die unkomplizierte Aufbewahrung der Zellen ermöglicht eine einfache Handhabung und Anwendung von Cyanobakterien als Katalysatoren.

Nach diesen ersten vielversprechenden Ergebnissen wurde das Substratspektrum des photobiokatalytischen Reduktionssystems untersucht (Tabelle 1). Es konnte gezeigt werden, dass das System auf ein breites Spektrum an Substraten anwendbar ist. Ein Verlust von bis zu 20 % der

streicht, dass es sich bei der enantioselectiven Reduktion tatsächlich um einen katalytischen Prozess handelt. Um den Einfluss der Menge an aktivem Enzym zu klären, wurde zusätzlich der Umsatz von Substrat **6a** durch zwei YqjM-Varianten mit verschiedenen Protein-tags untersucht. Es ist bekannt, dass die Wahl des N-terminalen Fusionsproteins die Faltung und spezifische Aktivität der Enoat-Reduktasen beeinflusst.^[12] Zellen, in denen YqjM als Fusionsprotein mit einem Streptavidin-tag exprimiert wurde, zeigten eine spezifische Aktivität gegenüber **6a** von $12\text{ U g}_{\text{CDW}}^{-1}$, wohingegen Zellen mit His-tag-gekoppelter YqjM eine spezifische Aktivität von $91\text{ U g}_{\text{CDW}}^{-1}$ aufwiesen. Die Menge an aktivem Enzym in der Zelle stellt also einen entscheidenden Faktor für die Aktivität des Biokatalysators dar.

Abschließend wurde ein Versuch unter semi-präparativen Bedingungen durchgeführt, bei dem eine Biotransformation von 100 mg **6a** binnen drei Stunden zu 81 mg enantiomerenreinem (*R*)-**6b** (80 % Ausbeute an isoliertem Produkt, > 99 % *ee*) führte.

Die Daten zeigen, dass die Produktivität des photoautotrophen Produktionssystems von drei substratabhängigen Faktoren bedingt wird: von der Aktivität des exprimierten Enzyms, von der Effizienz der NADPH-Bildung sowie von Nebenreaktionen, die zum Abbau des Substrats oder Produkts führen. Die maximale Produktbil-

dungsrates wird offensichtlich von der Konzentration und Aktivität des Enzyms, der Verfügbarkeit des reduzierten Cofaktors NADPH und dem Transport des Substrats und Produkts durch die Zellmembran beeinflusst. Vergleichende Experimente mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen zeigten eine maximale anfängliche Produktbildungsrate, was darauf schließen lässt, dass das Enzym die Umsetzung unter diesen Bedingungen optimal katalysiert.

Bei höheren Substratkonzentrationen treten Toxizitätseffekte auf, die sich auf die Lebensdauer der Zellen auswirken und dadurch den Umsatz verringern. Der Abbau der zugegebenen Substrate oder der gebildeten Produkte durch den zellulären Metabolismus ist ein häufiges Problem von Ganzzell-Biotransformationen, das auch hier beobachtet wurde. Es kann durch eine gezielte Deletion von Stoffwechselwegen^[13] oder durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen (wie für **6a** beschrieben) umgangen werden.

Wir zeigen hier zum ersten Mal die Anwendung eines cyanobakteriellen Photosystems für die Biotransformation mit rekombinanten Enzymen. Während lichtgetriebene Reaktionen im sichtbaren Wellenlängenbereich bereits ein erfolgreiches Konzept für die Anwendung in photochemischen^[14] und photobiokatalytischen^[5b,c,6a,15] Systemen sind, liegt die Stärke des hier gezeigten Ansatzes in der einfachen Anwendung und Produktion des Biokatalysators. Das System ist dabei allgemein auf alle Oxidoreduktasen übertragbar, die

Tabelle 1: Lichtkatalysierte Ganzzell-Biotransformation unterschiedlicher Substrate mithilfe rekombinanter Enoat-Reduktase YqjM in *Synechocystis*-sp.-6803-Zellen bei einer Zelldichte von 1.8 g L^{-1} .

Substrat	Substratkonz. [mM]	t [h]	spez. Aktivität [$\text{U g}_{\text{CDW}}^{-1}$] ^[a,b]	max. Produktbildungsrate [mm h^{-1}] ^[a]	Umsatz [%] ^[a]	Raum-Zeit-Ausb. [$\text{g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$]	Produktkonz. [g L^{-1}]	Zellproduktivität [$\text{g g}_{\text{CDW}}^{-1}$]
1a	15	4	39	4.1	70 ^[d]	0.03	0.1	0.06
2a	15	24	21.1	2.2	42	0.03	0.71	0.4
3a	10	24	6.2	0.7	57	0.04	0.9	0.5
4a	15	24	25.6	2.7	99	0.5	1.2	0.72
5a	15	24	53.2	5.7	94	0.64	0.83	0.46
6a	20	3.3	90.9	9.6	99	0.67	2.24	1.24
6a	10 ^[c]	1	123	10	99	1.1	1.1	0.62
7a	20	3	99.5	10.5	99	0.63	1.9	1.05

[a] Bestimmt mittels Gaschromatographie. [b] Bestimmt nach 1 h. [c] 100-mg-Maßstab. [d] 0.5 % Bildung von Cyclohexanol wurde beobachtet.

flüchtigen Substanzen **1b** und **2b** ist vermutlich auf Verdunstung zurückzuführen. Bis auf Ketoisophoron (**3a**) wurden alle prochiralen Substrate mit hoher Enantioselectivität umgesetzt (Tabelle 1). Bei Versetzen einer Cyanobakterien-Kultur mit enantiomerenreinem Levodion ((*R*)-**3b**) zeigte sich, dass das Produkt unter den gewählten Reaktionsbedingungen leicht racemisiert.^[3c]

Während dieser Arbeit konnten eine volumetrische Produktivität von bis zu 10 mm h^{-1} und ein Produkttiter von bis zu 2 g L^{-1} erreicht werden. Dies ist zwar noch zu gering für eine industrielle Anwendung, bietet aber einen sehr vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Optimierungen. Besonders die spezifische Aktivität des Biokatalysators erfüllt mit bis zu 100 U g^{-1} bereits Ansprüche an eine industrielle Anwendung. Die beobachtete Produktbildungsrate von 2 mm h^{-1} bei $1.8\text{ g}_{\text{CDW}}\text{ L}^{-1}$ entspricht dabei einer Umsatzgeschwindigkeit von 20000 s^{-1} pro Zelle. Ein Vergleich der Substrate **1a–3a** zeigt, dass bereits kleine Unterschiede in der Substratstruktur einen signifikanten Einfluss auf die spezifische Aktivität haben. Die Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute oder Vergrößerung des Substratspektrums für eine erfolgreiche industrielle Anwendung bedarf jedoch noch weiterer Optimierung mittels Reaktions- und Enzym-Engineering. Durch His-tag-Aufreinigung konnten 8.4 mg reines Enzym aus 1 g Zellen isoliert werden. Die entsprechende Gesamtumsatzzahl von 18750 pro Enzymmolekül unter-

Elektronen von den zellulären Donoren NADPH, NADH oder Ferredoxin akzeptieren. Die hohen Umsätze sowie die beschriebene Enantioselektivität zeigen die Praktikabilität der Cofaktor-Regeneration durch Wasser und Licht. Der enorme Fortschritt bei molekularbiologischen Methoden für photosynthetische Mikroorganismen ermöglicht weitere Optimierungen der Enzymexpression und kann damit die Gesamteffektivität des Systems erhöhen. Die Produkttitel der meisten aktuellen Beispiele zur Anwendung von Cyanobakterien für die Synthese organischer Moleküle^[16] bewegen sich, obwohl sehr vielversprechend, doch meist nur im mg L^{-1} -Bereich. Im Unterschied dazu ermöglichen Ganzzell-Photobiotransformationen Produktkonzentration von mehreren g L^{-1} . Die hier gezeigten Produktkonzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten des nichtoptimierten Systems sind im aktuellen Stadium für eine industrielle Anwendung noch zu gering. Molekularbiologische Methoden, wie die Verwendung kontrollierbarer Promotoren, bieten hier ein erhebliches Optimierungspotenzial. Cyanobakterien nutzen nur einen kleinen Teil der adsorbierten Lichtenergie, da die Zellen aufwändige Mechanismen zum Schutz vor raschen Schwankungen der Lichtintensität unterhalten. Da diese Schutzmechanismen unter kontrollierten Kultivierungsbedingungen nicht benötigt werden, bietet ein Engineering des photosynthetischen Elektronenflusses eine weitere Möglichkeit für die Erzeugung reduzierter Cofaktoren für synthetische Biotransformationen. Der Einsatz rekombinanter Cyanobakterien als Katalysatoren ist ein erster Schritt in diese Richtung.

Danksagung

Dem Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen (Fördernr.: PtJ-TRI/1411ng006) und dem Mercator Research Center Ruhr (Pr-2013-0010) sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Stichwörter: Biotechnologie · Enzymkatalyse · Photokatalyse · Photosynthese · Reduktionen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5582–5585
Angew. Chem. **2016**, *128*, 5672–5675

- [1] R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008–2022; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2108–2123.
- [2] a) B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3132–3158; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194; c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285–2313.
- [3] a) H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 892–914; b) R. Stürmer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 203–213; c) A. Fryszkowska, H. Toogood, M. Sakuma, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, N. S. Scrutton, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2976–2990.
- [4] Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 930–943.
- [5] a) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762–782; b) D. I. Perez, M. Mifsud Grau, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2009**, 6848–6850; c) E. Churakova, M. Kluge, R. Ullrich, I. W. C. E. Arends, M. Hofrichter, F. Hollmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *123*, 10904–10907; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10904–10907.
- [6] a) M. Mifsud, S. Gargiulo, S. Iborra, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, A. Corma, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3145; b) J. Ryu, D. H. Nam, S. H. Lee, C. B. Park, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12020–12025.
- [7] L. Balcerzak, J. Lipok, D. Strub, S. Lochyński, *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 1523–1536.
- [8] M. Górak, E. Żymaniak-Duda, *Green Chem.* **2015**, *17*, 4570–4578.
- [9] a) H. H. Huang, P. Lindblad, *J. Biol. Eng.* **2013**, *7*, 10; b) H. H. Huang, D. Camsund, P. Lindblad, T. Heidorn, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2577–2593.
- [10] M. Bartsch, S. K. Gassmeyer, K. Koninger, K. Igarashi, P. Liauw, N. Dyczmons-Nowaczyk, K. Miyamoto, M. Nowaczyk, R. Kourist, *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 53.
- [11] a) M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3934–3937; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4008–4011; b) T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19891–19897.
- [12] T. B. Fitzpatrick, S. Auweter, K. Kitzing, T. Clausen, N. Amrhein, P. Macheroux, *Protein Expression Purif.* **2004**, *36*, 280–291.
- [13] F. Falcioni, B. Buhler, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 322–330.
- [14] a) J. Jin, D. W. C. MacMillan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1565–1569; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1585–1589; b) J. Jin, D. W. C. MacMillan, *Nature* **2015**, *525*, 87–90; c) H. H. Huo, X. D. Shen, C. Y. Wang, L. L. Zhang, P. Rose, L. A. Chen, K. Harms, M. Marsch, G. Hilt, E. Meggers, *Nature* **2014**, *515*, 100–103.
- [15] a) S. Kochius, Y. Ni, S. Kara, S. Gargiulo, J. Schrader, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 1554–1557; b) F. Hollmann, A. Taglieber, F. Schulz, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2903–2906; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2961–2964; c) J. H. Park, S. H. Lee, G. S. Cha, D. S. Choi, D. H. Nam, J. H. Lee, J.-K. Lee, C.-H. Yun, K. J. Jeong, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 969–973; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 983–987; d) J. H. Kim, M. Lee, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6364–6368; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6482–6486; e) S. H. Lee, J. H. Kim, C. B. Park, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4392–4406; f) J. H. Kim, M. Lee, J. S. Lee, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 517–520; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 532–535; g) N. H. Tran, D. Nguyen, S. Dwaraknath, S. Mahadevan, G. Chavez, A. Nguyen, T. Dao, S. Mullen, T. A. Nguyen, L. E. Cheruzel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14484–14487; h) A. Bachmeier, B. J. Murphy, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12876–12879; i) Y. S. Chaudhary, T. W. Woolerton, C. S. Allen, J. H. Warner, E. Pierce, S. W. Ragsdale, F. A. Armstrong, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 48, 58–60.
- [16] A. Włodarczyk, T. Gnanasekaran, A. Z. Nielsen, N. N. Zulu, S. B. Mellor, M. Luckner, J. F. B. Thofner, C. E. Olsen, M. S. Mottawie, M. Burowa, M. Pribil, I. Feussner, B. L. Moller, P. E. Jensen, *Metab. Eng.* **2016**, *33*, 1–11.

Eingegangen am 2. Februar 2016
Online veröffentlicht am 29. März 2016