

**Strain and process engineering for the fermentative
production of secondary metabolites in *Pseudomonas* sp.
strain VLB120**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr.-Ing.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Karsten Lang

aus

Wuppertal

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schmid
2. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Wichmann

Dortmund 2014

Chemical Biotechnology
Prof. Dr. Andreas Schmid (ed.)

Karsten Lang

**Strain and process engineering for the fermentative
production of secondary metabolites
in *Pseudomonas* sp. strain VLB120**

Volume 19

D 290 (Diss. Technische Universität Dortmund)

Shaker Verlag
Aachen 2015

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Dortmund, Technische Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-3419-6

ISSN 1868-0283

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Acknowledgements

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Andreas Schmid, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie in Dortmund anzufertigen. Sein Enthusiasmus und seine Überzeugungsfähigkeit als auch der wissenschaftliche Freiraum, den er mir gewährte, sorgten dafür, dass diese Arbeit für mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich eine großartige Erfahrung wurde.

Meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Rolf Wichmann danke ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens. Außerdem bin ich ihm dankbar für die genaue Durchsicht meiner Arbeit und die hilfreichen Korrekturen und Kommentare. Bei Herrn Prof. Andrzej Górak möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, als Prüfer zu fungieren.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Katja Bühler, die trotz der Doppelbelastung von Familie und Beruf immer für mich erreichbar war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Insbesondere bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit und meiner Manuskripte konnte ich mich immer auf ihre vielen hilfreichen Kommentare und Korrekturen verlassen.

Besonderer Dank gilt auch den von mir betreuten Studenten (Matthias, Sören, Ninja, Johannes, Sebastian und Jessica), die im Rahmen Ihrer Bachelorarbeiten und Hiwi-Tätigkeiten zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben. Hervorzuheben ist hier Jessica Zierow, die durch ihren unermüdlichen Einsatz und aufgrund ihrer großen Fähigkeiten zum Erfolg des Gesamtprojektes vorangetrieben hat.

Um die Motivation und Beharrlichkeit, meine Ziele zu erreichen, über den gesamten Zeitraum dieser Dissertation hochzuhalten, waren meine Bürokollegen sehr hilfreich. Gerade in der finalen Besetzung mit Jianan, Martin, Jan, Düse, Katrin und Verena herrschte eine sehr gute Atmosphäre. An dieser Stelle möchte ich besonders die gute Zusammenarbeit mit meinen Kollegen Jan und Martin erwähnen, die sich ebenfalls mit der Stammentwicklung von *Pseudomonas* sp. strain VLB120 beschäftigt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biotechnologie bedanken, die zur hervorragenden Arbeitsatmosphäre beigetragen haben – Dank an Anja, Babu, Bart, Birgitta, Bruno, Christian D., Christian W., Christine, Dani, Eleni, Francesco, Frank, Jochen, Jon, Kamila, Karolin, Kerstin, Lars, Linde, Mani, Marcel, Marvin, Mattijs, Michael, Nadine, Rainer, Rohan, Oliver, Patty, Sabine, Sjef, Stefanie.

Bei Katharina Koch vom Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik möchte ich mich für Ihre Unterstützung bei der Simulationsarbeit und bei der Prüfungsvorbereitung bedanken.

Dem CLIB-Graduate Cluster danke ich für mein Promotionsstipendium und die einhergehende finanzielle Unterstützung des Projektes.

Auch möchte ich mich im Besonderen bei meiner Familie bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und meiner Promotion nicht nur finanziell, sondern auch moralisch sehr unterstützt hat. Besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Jana, die mich immer unterstützt und aufgebaut hat und häufig, in Phasen, in denen sich das Projekt nicht geradlinig entwickelt hat, meinen Frust ertragen musste. Ohne diese Unterstützung wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen.

Table of contents

Acknowledgements	I
Table of contents	III
Summary	V
Zusammenfassung	VI
List of abbreviations	VII
 Chapter 1: General Introduction	 1
1.1 Biotechnology – towards a sustainable bioeconomy	2
1.1.1 General definitions	2
1.1.2 White (industrial) biotechnology	2
1.1.3. Biocatalysis	3
1.2 Biorefineries	4
1.2.1 Chemical and material products	4
1.2.2 Biofuels	6
1.2.3 Fermentation performance of state of the art biocatalysts	8
1.3 Metabolic engineering towards biofuels and biomaterials	10
1.3.1 Ehrlich pathway	12
1.3.2 2-Keto acid decarboxylases	13
1.4 Solvent tolerance	15
1.4.1 Solvent tolerance mechanism	16
1.4.2 Solvent toxicity of alcohols considered as biofuels	17
1.5 Bioprocess development	18
1.5.1 Enzyme engineering	19
1.5.2 Cell engineering	20
1.5.3 Reaction engineering	20
1.5.4 Process engineering	21
1.6 Continuous biocatalytic processes	21
1.7 Biofilms: a promising approach towards continuous, integrated bioprocesses	23
1.7.1 Mass transport in biofilms	25
1.8 <i>Pseudomonas</i> sp. – a versatile biocatalyst	27
1.8.1 Solvent tolerant, biofilm forming <i>Pseudomonas</i> sp. strain VLB120	29
1.9 Scope of this thesis	30
 Chapter 2: Butanol tolerance: a question of host and lifestyle	 31

Chapter 3: Metabolic engineering of <i>Pseudomonas</i> sp. strain VLB120 as platform biocatalyst for the production of isobutyric acid and other secondary metabolites	49
Chapter 4: Introduction and deletion of highly-specific isobutyraldehyde dehydrogenases boosts isobutanol production in <i>Pseudomonas</i> sp. strain VLB120	75
Chapter 5: Biosynthesis of the chiral building block 3-hydroxyisobutyric acid from glucose	101
Chapter 6: Application of recombinant <i>Ps.</i> sp. strain VLB120 B83 biofilms for the production of 3-hydroxyisobutyric acid.....	119
Chapter 7: Towards integrated bioprocesses for the production of isobutyric acid and isobutanol ...	129
Chapter 8: General discussion	151
Chapter 9: Conclusion and Outlook	167
Chapter 10: Appendix.....	173
Chapter 11: References.....	187
Curriculum vitae	205

Summary

Due to the foreseeable shortage of fossil resources in the future and the environmental concerns connected to a fossil-based economy, bio-based sustainable processes are more and more in the focus of academic and industrial research. A major bottleneck in this respect is the lack of appropriate whole-cell biocatalysts, tolerant towards relevant reactants and process conditions.

This thesis focuses on *Pseudomonas* sp. strain VLB120, which is known for its intrinsic solvent tolerance towards a variety of toxic chemicals. Using an extensive metabolic engineering approach, the Ehrlich pathway, catalyzing the decarboxylation of 2-ketoacids to the respective alcohols and acids, was overexpressed in the desired host. This allowed the production of three different classes of products directly from glucose: isobutanol, isobutyric acid, and (*S*)-3-hydroxyisobutyric acid. The accumulation of isobutyric acid (2.4 g L^{-1}) and (*S*)-3-hydroxyisobutyric acid (2.3 g L^{-1}) was achieved following a genome based random mutagenesis approach with subsequent screening for suitable hosts. The production of isobutanol was naturally limited, due to the kinetically preferred oxidation of its precursor isobutyraldehyde. Using transcriptome analysis responsible aldehyde dehydrogenases were identified and their deletion led to the accumulation of 0.8 g L^{-1} isobutanol. The ability of the strain to form stable biofilms was used in biofilm membrane reactors for the continuous production of 0.6 g L^{-1} 3-hydroxyisobutyric acid. Transmembrane oxygen diffusion was identified as critical process parameter. Due to the toxicity of the described compounds, process integration is essential for overall process economics. Thus, *in situ* separation of isobutanol using gas-stripping, and the abiotic reactive extraction of isobutyric acid using the quaternary ammonium salt Aliquat 336, were investigated and the successful separation of isobutanol during fermentations was demonstrated.

This thesis sets the stage towards the development of *Ps.* sp. strain VLB120 as biofilm-based, solvent tolerant chassis aiming for sustainable, continuous, process integrated production of chemicals.

Zusammenfassung

Die Verwendung fossiler Ressourcen ist vor dem Hintergrund der Rohstoffverknappung und der Klimaproblematik auf lange Sicht nicht tragbar. In diesem Zusammenhang gewinnen nachhaltige, biobasierte Prozesse zunehmend an Bedeutung. Ein limitierender Faktor bei dieser Entwicklung ist der Mangel an adäquaten Ganzzell-Biokatalysatoren, welche tolerant gegenüber industriell relevanten Produkten sind.

Diese Arbeit fokussiert auf *Pseudomonas* sp. strain VLB120, einem Stamm, der aufgrund seiner intrinsischen Toleranz gegenüber diversen toxischen Chemikalien prädestiniert als Produktionsstamm erscheint. Durch intensives metabolic engineering wurden die Gene des Ehrlich-Stoffwechselwegs, der die Decarboxylierung von 2-Ketosäuren zu den entsprechenden Alkoholen und Carbonsäuren katalysiert, in diesem Stamm überexprimiert. Dies ermöglichte die Produktion von drei verschiedenen Produktklassen aus Glukose: dem Biokraftstoff Isobutanol, der Bulkchemikalie Isobuttersäure und der chiralen Feinchemikalie (*S*)-3-Hydroxyisobuttersäure. Die Akkumulation von Isobuttersäure (2.4 g L^{-1}) und (*S*)-3-Hydroxyisobuttersäure (2.3 g L^{-1}) gelang nach zufallsgerichteter Genommutation und der Selektion von geeigneten Produktionsstämmen. Die Produktion von Isobutanol ist nativ durch die kinetisch bevorzugte Oxidation der Vorstufe Isobutyraldehyd limitiert. Durch Transkriptom-Analyse gelang die Identifikation der verantwortlichen Aldehyd Dehydrogenasen. Ihre gezielte Ausschaltung resultierte in der Akkumulation von 0.8 g L^{-1} Isobutanol. Die Eigenschaft von *Ps.* sp. strain VLB120, stabile Biofilme auszubilden, wurde in Biofilm-Membran-Reaktoren ausgenutzt, um kontinuierlich bis zu 0.6 g L^{-1} 3-Hydroxyisobuttersäure zu produzieren. Transmembrane Sauerstoffdiffusion wurde hierbei als kritischer Prozessparameter identifiziert. Aufgrund der beschriebenen Toxizität der betrachteten Verbindungen ist eine Prozessintegration für einen industriell wirtschaftlichen Prozess essentiell. Um dies zu ermöglichen, wurde die *in situ* Separation von Isobutanol mittels Gas-Stripping und die abiotische Reaktivextraktion von Isobuttersäure mittels der quartären Ammoniumverbindung Aliquat 336 untersucht und die erfolgreiche Abtrennung von Isobutanol während der Fermentation realisiert.

Diese Arbeit bildet die Basis für die Weiterentwicklung von *Ps.* sp. strain zu einem biofilmbildenden, lösungsmitteltoleranten Chassis mit dem Ziel der kontinuierlichen, prozessintegrierten Produktion von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen.

List of abbreviations

μ	Growth rate (h^{-1})
2KB	2-ketobutyrate
a	Penetration depth (m)
A	Interfacial area (m^2)
ABE	Acetone, butanol, ethanol
AcrB	RND-type permease - multidrug efflux pump
ADH	Alcohol dehydrogenase
ADP	Adenosine diphosphate
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
<i>alsS</i>	Acetolactate synthase gene
app	Apparent
ATP	Adenosine triphosphate
bdw	Biofilm dry weight (g L^{-1})
BHI	Brain heart infusion
<i>bkd</i>	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster
BTX	Benzene, toluene and xylene
C_a	Solvent concentration in the aqueous solution (mmol L^{-1})
CDS	Coding DNA sequences
cdw	Cell dry weight (g L^{-1})
CFUs	Colony forming units
<i>cimA</i>	Citrate-malate synthase gene
Cm	Chloramphenicol
CNG	Compressed natural gas
CoA	Coenzyme A
D	Dilution rate (h^{-1})
D_{aq}	Diffusion coefficient of a respective solute in water ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
DCPK	Dicyclopropyl ketone
D_e	Effective diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSP	Downstream processing
DXP	Deoxyxylulose-5-phosphate
<i>ee</i>	Enantiomeric excess
EERE	The office of Energy Efficiency and Renewable Energy
EPS	Extracellular polymeric substances
EROI	Energy return of invest
FAD	Flavin adenine dinucleotide
<i>gad</i>	Gluconate dehydrogenase gene
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate
GC	Gas chromatography
<i>gcd</i>	Glucose dehydrogenase gene
Gm	Gentamycin
H_c	Henry's law constant ($\text{L bar mol}_{\text{gas}}^{-1}$)
HIBA	Hydroxyisobutyric acid
HPLC	High performance liquid chromatography
IBA	Isobutyric acid
<i>ilvC</i>	2-Hydroxy-3-keto-acid reductoisomerase gene
<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase gene
<i>ilvE</i>	Branched-chain-amino-acid transaminase gene
<i>ilvIH</i>	Acetolactate synthase gene
IM	Inner membrane
IPP	Isopentenyl-pyrophosphate
ISPR	<i>in situ</i> product removal
J_m	Transmembrane flux ($\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$)

k_0	Reaction rate constant ($\text{mmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$)
KDC	2-Keto acid decarboxylase
k_g^{st}	Gas film mass transfer coefficient of the solvent (m h^{-1})
K_i	Michaelis inhibition constant ($\text{mol}_{\text{substrate}} \text{L}^{-1}$)
KIV	Ketoisovalerate
<i>kivd</i>	2-Ketoisovalerate decarboxylase gene
k_l^{st}	Liquid film mass transfer coefficient of the solvent (m h^{-1})
Km	Kanamycin
K_m	Michaelis dissociation constant ($\text{mol}_{\text{substrate}} \text{L}^{-1}$)
k_m	Mass transfer coefficient ($\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{Pa}^{-1}$)
KMV	2,3-Methylvalerate
LB	Lysogeny broth
<i>ldhA</i>	Lactate dehydrogenase gene
<i>leuA</i>	2-Isopropylmalate synthase gene
<i>leuB</i>	3-Isopropylmalate dehydrogenase gene
<i>leuCD</i>	Isopropylmalate isomerase gene
LPG	Liquid petroleum gas
MCS	Multiple cloning site
<i>mmsA</i>	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase gene
MMSALDH	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenases
<i>mmsB</i>	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase gene
NAD(P/H)	(reduced) Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
OD_{450}	Optical density at 450 nm
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OM	Outer membrane
OprB	Outer membrane porin B
<i>panB</i>	Ketopantoate hydroxymethyl transferase gene
<i>panC</i>	Pantothenate synthetase gene
<i>panE</i>	Ketopantoic acid reductase gene
PEP	Phosphoenolpyruvate
PHA	Polyhydroxyalkanoates
PLP	pyridoxal-5'-phosphate
P_{ow}	Partition coefficient n-octanol/water (-)
PQQ	Pyrroloquinoline quinone
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransferase gene
<i>pyc</i>	Pyruvate carboxylase gene
r	Resistance
R	Universal gas constant ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
RI	Refractive Index
r^{st}	Stripping rate of a solvent from an aqueous solution ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
S_0	Solute concentration in the bulk phase (mmol L^{-1})
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SSALDH	Succinic semialdehyde dehydrogenases
STY	Space time yield ($\text{g}_{\text{product}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
T	Absolute temperature (K)
TPP	Thiamine pyrophosphate
U	Unit ($\mu\text{mol}_{\text{product}} \text{min}^{-1}$)
V	total volume (m^3)
V_{max}	Maximum reaction velocity ($\text{U g}_{\text{cdw}}^{-1}$)
X	Biofilm density ($\text{g}_{\text{bdw}} \text{L}^{-1}$)
δ	Wall thickness (m)