Synthetic biology for synthetic chemistry
-
Microbial *de novo* production and selective functionalization of limonene

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

D I S S E R T A T I ON

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer nat.

vorgelegt von

M. Sc. Christian Willrodt

geboren am 15.05.1986 in Oberhausen

Dekan: Prof. Dr. Erich Schröger

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schmid (Universität Leipzig)

Prof. Dr. Sven Panke (ETH Zürich)

Tag der Verteidigung: 15.01.2016

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

Christian Willrodt

Synthetic biology for synthetic chemistry – Microbial *de novo* production and selective functionalization of limonene

Volume 22

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung/Universität Leipzig

Shaker Verlag
Aachen 2016

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.: Leipzig, Univ., Diss., 2016

Copyright Shaker Verlag 2016
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 978-3-8440-4296-2
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

Four joyful and instructive, though sometimes also very tough, years of my PhD work in Dortmund and Leipzig went by and I would like to express my gratitude to numerous contributors, advisors and friends.

First and foremost I am deeply grateful to my doctoral father Prof. Andreas Schmid for welcoming me at the Laboratory of Chemical Biotechnology and accompanying me for such a long time from student assistant to finishing my PhD thesis. Thank you, Andreas, for your optimistic, trustful, and always inspiring way of guidance covering the entire range from minutely detailed to very global. Thank you also for sharing and conveying your knowledge and preciseness for communicating (not only) science in a very convincing way.

Especially I wish to thank my supervisor Dr. Mattijs Julsing. Thank you, Mattijs, for your steady advice, trust, and the freedom you gave me to evolve both our monoterpene research project and my scientific skills. Thank you also for sharing your flat for quite a time, the great time aside and after work, and for being a friend.

Another important person whom I would like to thank is Dr. Bruno Bühler, who, although I was not part of his "sub-group", supported me in any situation. I am admiring your brilliant skill of rapidly grasping complex scientific coherences and to ask the right questions at the right time. I hope that I could adopt some of these abilities. Thank you, Bruno.

I also wish to thank Prof. Sven Panke for his willingness to be the second reviewer of my doctoral thesis and the members of my Promotionskommission Prof. Gunhild Layer, Prof. Hauke Harms, and Prof. Tilo Pompe.

I am deeply indebted to my students, Christian David and Anna Hoschek, who contributed to progress of this thesis by (sometimes exhausting) hands-on experimental work. Christian and Anna thank you very much, the achievements of this work would not have been possible without your support. Special thanks also go to my graduate student Stefan Michelke for his contributions on another interesting research topic, which could unfortunately not yet be integrated in this thesis.

I am grateful to the other co-authors, Rohan, Babu, Sjef, Jessica, Lisa, and Katja of the manuscripts implemented in this thesis for their valuable contributions and their willingness to share their expertise. Rohan, thanks for conveying your inspiring way of systematizing science to me.

Very special thanks also go to my former and current office mates Karo, Kerstin, Bart, Babu, and Marvin for creating a pleasant atmosphere and for being much more than only colleagues.

As productive work, especially in science, is hardly possible without a comfortable atmosphere during working and free-time activities, I wish to send many thanks to all (former) colleagues and friends of the BT (now partially SoMa) group: (Anja Kulmsee, Anja Siegismund, Anna, Bart, Bruno, Christian, Christine, Dani, Diego, Düse, Eleni, Francesco, Jan, Jianan, Jochen, Jon, Kamila, Karo, Karsten, Katja, Katrin, Kerstin, Kirsten, Kristin, Linde, Magdalena, Mani, Marcel, Martin, Marvin, Mattijs, Michael, Nadine, Olli, Özde, Patty, Rohan, Ron, Sabine, Sebastian, Sjef, Stephanie, Suresh, Verena).

Finally, I would like to take the opportunity to thank some people who made me what I am today, my friends and my family. I am especially indebted to my mother and my siblings and the rest of the family who supported me all the time and gave me the strength to get over the loss of my (step)father, who passed away much too early. Mom, Thorben, and Jenny, thank you so much for your love! Special thanks also go to Annika, Gerd, and Angelika who accompanied and supported me for a large share of my life. I´ll be always grateful for all that you´ve done for me.

Thank you so much, Anna, for giving me security in a very hard time and for your unconditional love!

Für Uwe Neutert,

der mehr als mein Stiefvater war

Table of contents

Acknowledgements I

Table of contents V

Summary VII

Zusammenfassung IX

List of abbreviations XII

Chapter 1 General introduction 1

Chapter 2 Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media 25

Chapter 3 Coupling limonene formation and oxyfunctionalization by mixed-culture resting cell fermentation 49

Chapter 4 Decoupling production from growth boosts fermentative limonene formation 77

Chapter 5 Continuous multi-step synthesis of perillic acid from limonene in a segmented-flow biofilm reactor 97

Chapter 6 General discussion – Guiding efficient microbial synthesis of non-natural chemicals by physicochemical properties of reactants 115

Chapter 7 Conclusions & Outlook 133

Chapter 8 References 143

Chapter 9 Appendix 169

Curriculum vitae 175

Summary

The recent progress in biotechnological disciplines, such as metabolic engineering or synthetic biology, increased the interest of chemical and pharmaceutical industries to implement microbial processes for the synthesis of chemicals. However, most microorganisms, e.g., *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae*, used in biotechnological applications are not evolved by nature for the production of industrially relevant compounds, which are often hydrophobic, non-charged, volatile, or toxic to the microbial organisms. Bioprocess design relies on an integrated approach addressing pathway, cellular, reaction, and process engineering to combine the results of natural evolution with the demands of industrial applicability.

In this thesis, the microbial *de novo* production and selective oxyfunctionalization of the highly volatile isoprenoid limonene was investigated as a model system featuring reactants with challenging physicochemical characteristics. The cyclic monoterpene limonene and its oxygenated adducts are extensively used in the fragrance, food, and cosmetic industries due to their olfactory and antimicrobial properties. Key constraints that limit (*S*)-(-)-limonene biosynthesis in recombinant *E. coli*, related to genetics, physiology, and reaction engineering, were identified. A recombinant limonene overproducing *E. coli* strain expressing the yeast mevalonate pathway genes alongside plant derived genes for geranyl diphosphate and limonene synthase was constructed. An aqueous-organic high cell density fermentation allowed for gram-scale production of limonene (2.7 g L_{org}^{-1}) and the facile purification of enantiomerically pure (*S*)-(-)-limonene.

This and other reported isoprenoid fermentation processes rely on growing recombinant microbial biocatalysts, which are typically robust and self-regenerating. However, the fermentative production of isoprenoids has to compete with carbon fluxes and energy supply for cellular maintenance and growth. The potential of an alternative biocatalyst configuration using non-growing, but metabolically active *E. coli* cells was evaluated to increase the availability of cellular resources for the formation of limonene. The use of non-growing cells resulted in more than fivefold increased specific limonene yields with respect to cell dry weight and glucose as compared to the approach featuring growing cells. The stability of the resting cell biocatalyst was initially limiting, but could be enhanced by optimization of the fermentation medium leading to high and stable limonene production rates for up to eight hours and a high specific yield of more than 50 mg per gram cell dry weight.

A bacterial cytochrome P450 limonene hydroxylase was incorporated into the limonene producing strain to synthesize the pharmaceutically active limonene adduct perillyl acetate. Cultivation of this strain in a batch-fermentation resulted in ineffective limonene synthesis and poor cytochrome P450 gene expression. Three strategies of genetic engineering, including the optimization of cytochrome P450 gene expression, the use of a translational fusion between limonene synthase and cytochrome P450, and the application of a membrane bound hydroxylase, did result in the production of (*S*)-(-)-perillyl acetate using growing *E. coli*. However, the titers remained low, probably as a consequence of fast limonene extraction into surrounding environment. Therefore, the concept of mixed-culture resting cell fermentation was introduced. Both, a limonene producing strain and a strain containing the monooxygenase components were grown separately and combined as resting cells in a defined ration. Mixed-culture resting cell fermentations resulted in the effective production of oxygenated monoterpenoids.

The efficiency of many biocatalytic reactions involving industrially interesting reactants is constrained by toxification of the applied biocatalyst. Solvent-tolerant *Pseudomonas putida* GS1, catalyzing selective limonene oxidation via the *p*-cymene degradation pathway, and recombinant *P. taiwanensis* VLB120 were evaluated for continuous perillic acid production. Here, toxicity limitations during the multi-step oxyfunctionalization of limonene to perillic acid were overcome by the combination of biological and technological strategies. A tubular segmented-flow biofilm reactor enabling membrane mediated substrate supply and efficient *in situ* product removal was used. The productivity of *P. putida* GS1 was highly dependent on the carbon source and reached 35 g L_{tube} day^{-1} when glycerol was supplied. 10-fold lower productivities, irrespective of the applied carbon source, were reached when the recombinant *P. taiwanensis* VLB120 harboring *p*-cymene monooxygenase and *p*-cumic alcohol dehydrogenase was cultivated as a biofilm under segmented flow conditions. The preparative perillic acid synthesis was verified by purification of product from the outlet stream.

The described strategies are complementary to and can be combined with metabolic and pathway engineering approaches aiding in developing sustainable and efficient bioprocesses for the *de novo* synthesis of valuable and pharmaceutically active isoprenoids from renewable resources. Furthermore, the strategies can be transferred to other microbial syntheses that feature reactants with similar physicochemical properties and, therefore, require similar efforts in pathway, cell, reaction, and process engineering.

Zusammenfassung

Das Interesse der chemischen und pharmazeutischen Industrie, traditionelle chemische Verfahren durch mikrobielle Produktionsprozesse für die Synthese von Gebrauchschemikalien zu ersetzen, wächst zunehmend. Diese Entwicklung wird insbesondere durch den Fortschritt in den biotechnologischen Disziplinen, wie Metabolic Engineering oder Synthetische Biologie unterstützt. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die Produktion hydrophober, ungeladener, flüchtiger und toxischer Chemikalien dar, da die meisten industriell eingesetzten Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevsiae*, evolutiv nicht für die Synthese von Substanzen mit den genannten physikochemischen Eigenschaften optimiert sind. Um das Ergebnis der natürlichen Evolution mit den Anforderungen der industriellen Anwendbarkeit zu vereinen ist ein integrierter Ansatz, der die verschiedenen Ebenen der Bioprozessentwicklung adressiert, notwendig. Dieser Ansatz beruht auf der aufeinander abgestimmten Optimierung des metabolischen Stoffwechselweges, der Zelle als Biokatalysator, sowie der beteiligten Reaktions- und Prozesstechnik.

In dieser Arbeit wurde die mikrobielle *de novo* Synthese und selektive Funktionalisierung des aliphatischen und flüchtigen Isoprenoids Limonen als Modellsystem für die Synthese und Prozessierung von Reaktanden mit, in Bezug auf den mikrobiellen Biokatalysator, nicht natürlichen physikochemischen Eigenschaften, untersucht. Das zyklische Monoterpen Limonen und dessen oxygenierte Addukte finden aufgrund ihrer olfaktorischen und antimikrobiellen Eigenschaften vielfache Verwendung in der Duftstoff-, Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Schlüsselbedingungen, welche die Biosynthese von (*S*)-(-)-Limonen in rekombinanten *E. coli* Stämmen in Bezug auf genetische, physiologische und reaktionstechnische Faktoren limitieren, zu identifizieren und aufzuheben. Dazu wurde zunächst, durch die heterologe Überexpression des Mevalonat Stoffwechselweges der Bäckerhefe, einer Geranylpyrophosphat und einer Limonene Synthase, ein (*S*)-(-)-Limonen produzierender Stamm entwickelt. In einer organisch-wässrigen Hochzelldichtefermentation konnte Limonen im Gramm-Maßstab (2.7 g L_{org}^{-1}) produziert und in entantiomerenreiner Form aufgereinigt werden.

Dieser und alle bisher publizierten Produktionsprozesse für Isoprenoide nutzen wachsende Zellen als Biokatalysatoren, da diese eine vergleichsweise hohe Robustheit und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufweisen. Dabei dient die Kohlenstoffquelle sowohl zur Synthese der

Isoprenoide, als auch zum Aufbau der Biomasse, wodurch es zu einer Kompetition beider Nutzungswege kommt. Um den Anteil des Kohlenstoffes zugunsten der Limonen Synthese zu verschieben, wurde das Potential ruhender, aber metabolisch aktiver Zellen als alternative Biokatalysator-Konfiguration evaluiert. Die Limonen Ausbeute in Bezug auf die eingesetzte Biomasse und Glukose konnte hiermit um das Fünffache erhöht werden. Die anfänglich limitierende Stabilität des nicht-wachsenden Biokatalysators, wurde durch die Optimierung des Fermentationsmediums verbessert. Schließlich wurde in $MgSO_4$-freiem Minimalmedium eine hohe und über acht Stunden stabile Limonen-Produktionsrate erzielt, wodurch eine sehr hohe spezifische Ausbeute (50 mg g_{cdw}^{-1}) erreicht werden konnte.

Zur Synthese des pharmazeutisch aktiven, oxygenierten Limonen Adduktes Perillyl Acetat wurde zusätzlich zum Limonen Biosyntheseweg eine bakterielle Cytochrom P450 Monooxygenase co-exprimiert. Beim Einsatz des rekombinanten Stammes in einer Batch-Fermentation war die Produktbildung anfänglich durch eine verringerte Limonen Synthese und ein niedriges Cytochrom P450 Expressionslevel limitiert. Daraufhin wurden drei unterschiedliche genetische Optimierungsstrategien angewendet, die auf der Erhöhung der Cytochrom P450 Expression, der Nutzung eines Fusionsproteins aus Limonen Synthase und Cytochrom P450, sowie der Verwendung einer membrangebundenen Monooxygenase basierten. Dennoch wurden dabei nur sehr geringe finale Konzentrationen erreicht, was auf die diffusive Ausschleusung von Limonen aus der Zelle, kinetisch der intrazellulären Oxidation überliegend, zurückgeführt wurde. Daher wurde ein neuartiges Fermentationskonzept enwickelt, welches auf der Mischung zweier ruhender Zellpopulationen beruht. Sowohl der Limonen-produzierende, als auch der Limonen-oxidierende Stamm wurden getrennt voneinander kultiviert und in definierten Verhältnissen in Form ruhender Zellen vereint. Diese Gemischtkulturfermentation führte schließlich zu einer effizienten Produktion des Monoterpenoids Perillyl Acetat.

Die Effizienz vieler biokatalytischer Reaktionen wird durch die Toxifizierung des verwendeten mikrobiellen Biokatalysators durch eingesetzte oder entstehende Reaktanden limitiert. In dieser Arbeit wurden der Lösungsmittel-tolerante Organismus *Pseudomonas putida* GS1, der die selektive Oxidation von Limonen zur Perillasäure über den nativen *p*-Cymol Abbauweg katalysiert, und ein entsprechend rekombinanter Organismus (*P. taiwanensis* VLB120) in Bezug auf ihre Fähigkeit zur kontinuierlichen Produktion von Perillasäure untersucht. Durch die Kombination biologischer und technischer Methoden konnte die Toxifizierung des Biokatalysators während dieser Mehrschrittoxidation vermieden werden. Es wurde ein tubulärer Biofilmreaktor eingesetzt, der auf einer Membran-

vermittelten Substratversorgung und der kontinuierlichen Entfernung des toxischen Reaktionsproduktes beruht. Die Produktivität des katalytischen *P. putida* GS1 Biofilmes war abhängig von der eingesetzten Kohlenstoffquelle und erreichte einen Maximalwert von 35 g $L_{Reaktor}$ d^{-1}. Die maximale Produktivität des rekombinanten Biofilmes war um etwa das Zehnfache geringer und wurde nicht durch die Art der eingesetzten Kohlenstoffquelle beeinflusst. Die Aufreinigung der produzierten Perillasäure zeigte die präparative Anwendbarkeit des Systems.

Die in dieser Arbeit angewendeten Strategien sind komplementär zu und kombinierbar mit Methoden des Metabolic Engineerings. Sie tragen durch neuartige Ansätze dazu bei, nachhaltige und effiziente biologische Prozesse zur industriellen Produktion von Isoprenoiden aus erneuerbaren Rohstoffen zu entwickeln und zu verbessern. Weiterhin können diese Strategien für andere Verbindungen eingesetzt werden, die ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen und dessen mikrobielle Produktion daher entsprechende Optimierung des Stoffwechselweges, der Zelle als Biokatalysator sowie der Reaktions- und Prozesstechnik benötigt.

List of abbreviations

2-LP	Two-liquid phase
μ	Growth rate [h^{-1}]
ABC	ATP-binding cassette
AGPPS2	Truncated, codon-optimized GPP synthase from *Abies granids*
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Chloramphenicol acetyltransferase
CDW	Cell dry weight
CoA	Coenzyme A
CSTR	Continuous stirred tank reactor
cymA	*p*-cymene monooxygenase from *Pseudomonas putida* GS1
cymB	*p*-cumic alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* GS1
cymC	*p*-cumic aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* GS1
cymD	Hypothetical protein from the *cym* operon of *Pseudomonas putida* GS1
CYP	Cytochrome P450 monooxygenase
CYP153A6	Cytochrome P450 from *Mycbacterium* sp. strain HXN1500
DCPK	Dicyclopropyl ketone
DINP	Diisononyl phthalate
DMAPP	Dimethylallyl diphosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSP	Downstream processing
DOXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
ee	Enantiomeric excess
EPS	Extracellular polymeric substances
Et_2O	Diethyl ether
EtOH	Ethanol
FdR	Ferredoxin reductase from *Mycbacterium* sp. strain HXN1500
FdX	Ferredoxin from *Mycbacterium* sp. strain HXN1500
FPP	Farnesyl diphsophate
g	Acceleration due to gravity
GC	Gas chromatography
GPP	Geranyl diphosphate
GRAS	Generally recognized as safe
*g*TME	Global transcription machinery engineering
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A
HMGR	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase
HMGS	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A synthase
HPLC	High performance liquid chromatography
IPP	Isopentenyl diphosphate
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ISPR	*In situ* product removal
κ	Degree of reduction
k	Mass transfer coefficient
k_{cat}	Catalytic constant [s^{-1}]
k_{cat}/K_M	Specificity constant [$M^{-1}\ s^{-1}$]
K_M	Michaelis dissociation constant [$mol_{substrate}\ L^{-1}$]
Kan	Kanamycin
K_P	Partition coefficient

KPi	Potassium phosphate buffer
K_s	Substrate uptake constant [$mol_{substrate}\ L^{-1}$]
L_{aq}, L_{org}, L_{tot}	Aqueous, organic, and total volume, respectively
logP	Octanol/water partition coefficient
LS	Truncated, codon optimized limonene synthase from *Mentha spicata*
M	Molar [mol L^{-1}]
MEP	2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate
MEV	Mevalonate
mg L_{aq}^{-1}	Theoretical concentration in the aqueous phase (calculated from organic phase concentrations using the aqueous:organic phase ratio)
mg L_{org}^{-1}	Measured concentration in the organic phase
MK	Mevalonate Kinase
MS	Mass spectrometry
MVA	Mevalonate
NAD(P/H)	(Reduced) Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD_{450}	Optical density at 450 nm
OD_{600}	Optical density at 600 nm
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
P	Pellet after centrifugation
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate
ppGpp	Guanosine tetraphosphate
PPP	Pentose phosphate pathway
PAc	Perillic acid
PAGE	Polyacrylamide gelelectrophoresis
PAH	Perillyl aldehyde
pAlkB	AlkB promoter
pBAD	*araBAD* promoter
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PMDC	Diphosphomevalonate decarboxylase
PMK	Phosphomevalonate kinase
POH	Perillyl alcohol
POHAc	Perillyl acetate
pTAC	*tac* promoter
RCA	Resting cell assay
RND	Resistance-nodulation-cell division superfamily
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute (rotation speed)
rt	Room temperature
SLIC	Sequence and ligation independent cloning
SN	Supernatant after centrifugation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
STY	Space time yield [$g_{product}\ L^{-1}\ h^{-1}$]
TCA	Tricarboxylic acid cycle
Tet	Tetracycline
tHMGR	Truncated 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase
U	Unit [$\mu mol_{product}\ min^{-1}$]
V	Operating volume
V_{max}	Maximum reaction velocity [U g_{cdw}^{-1}]
$Y_{p/x}$	Product yield on biocatalyst [$g_{product}\ g_{cdw}^{-1}$]
$Y_{p/s}$	Product yield on substrate [$g_{product}\ g_{substrate}^{-1}$]