

Pseudomonas and heterogeneity – benefits and challenges
for strain and process engineering

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Dr.-Ing.
von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Martin Lindmeyer

aus

Wuppertal

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat Andreas Schmid
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Rolf Wichmann

Dortmund 2016

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

Martin Lindmeyer

***Pseudomonas* and heterogeneity – benefits and
challenges for strain and process engineering**

Volume 24

D 290 (Diss. Technische Universität Dortmund)

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.: Dortmund, Technische 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 978-3-8440-4313-6

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

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Schmid für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Biotechnologie des Fachbereichs Bio- und Chemieingenieurwesen an der TU Dortmund anzufertigen. Andreas, vielen Dank für das hervorragende Arbeitsumfeld sowie deine wissenschaftliche und persönliche Förderung; beides war für mich eine großartige Erfahrung. Dankbar bin ich dir auch, dass ich meine Dissertation trotz deines Rufes nach Leipzig in Dortmund fertig stellen konnte.

Ich bedanke mich besonders bei meinem Betreuer Prof. Dr. Bruno Bühler. Seine außerordentlich sachkundige und wertvolle Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit sowie die zahlreichen, akribischen Korrekturen bei der Ausarbeitung der Dissertationsschrift haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Bruno, deine wissenschaftlichen Kenntnisse und dein Engagement sind außergewöhnlich. Ich bedanke mich bei dir für die stets geduldige und uneingeschränkte Bereitschaft, dein umfangreiches Wissen an mich weiterzugeben.

Ich danke ausdrücklich Prof. Dr. Rolf Wichmann für die Bereitschaft, meine Dissertation als Zweitgutachter zu bewerten. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. David Agar und Prof. Dr. Gerhard Schembecker für die Abnahme der Promotionsprüfung.

Besonderer Dank geht an meine Studenten Julia Bielecki, Janin Rösner, Claudia Obarowski, Sebastian Kreimeyer und Johannes Elischewski. Ihre im Rahmen von Studien-, Bachelor- und Masterarbeiten sowie Hiwi-Tätigkeiten erzielten Ergebnisse haben einen wesentlichen Teil zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Susann Müller und Dr. Michael Jahn für die ausgezeichnete Kooperation im Rahmen des „*Pseudomonas* 2.0“ Projektes bedanken. Besonders erwähnt sei, dass ohne eure flusszytometrischen Messungen die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gebührt meinen beiden Vorgängern auf dem Gebiet der Redox-Biokatalyse am Lehrstuhl für Biotechnologie, Herrn Dr. Daniel Kuhn und Herrn Dr. Daniel Meyer, die mit Ihren Ergebnissen den Grundstein zu dieser Dissertation legten.

Ein großer Dank geht an meine Mitdoktoranden sowie an alle Mitglieder und Freunde des Lehrstuhls für Biotechnologie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit sowie stets freundliche und lockere Atmosphäre (Anja, Babu, Bart, Birgitta, Bruno, Christian D., Christian W., Christine, Dani, Eleni, Francesco, Frank, Freddy, Jan, Jana, Jianan, Jochen, Jon, Kamilla, Karolin, Katrin, Kerstin, Kirsten, Lars, Linde, Mani, Marcel, Marvin, Mattijs, Michael, Nadine, Rohan, Oliver, Özde, Patty, Sabine, Sjef, Stefanie, Verena). In guter Erinnerung bleiben geniale Kaffeeraumpartys, Weihnachtsfeiern, Lehrstuhlsausflüge, Abende im Kraftstoff und Gänsemarkt,

Davos-Trips und überhaupt die schönen gemeinsamen Jahre. An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinen Bürokollegen für die lehrreiche und interessante, aber insbesondere lustige, Zeit bedanken (Jan, Karsten, Christian D., Jianan, Verena, Katrin). Ihr habt meine Eigenarten und Launen über vier Jahre ertragen – sowie ich eure – was mir immer in allerbesten Erinnerung bleiben wird.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Freundin, die mir während der Dissertationszeit immerzu unterstützend zur Seite standen.

TABLE OF CONTENTS

Summary	VII
Zusammenfassung	IX
List of abbreviations	XI
Symbols.....	XIII
CHAPTER 1 - GENERAL INTRODUCTION	1
1.1 Preface.....	2
1.2 Heterogeneity in prokaryotic populations and the underlying sources	3
1.3 Binary phenotypic distributions and its underlying mechanism	8
1.4 Flow cytometry deciphers phenotypic heterogeneity in bioprocesses.....	11
1.5 Heterogeneity in bioprocesses.....	13
1.6 The genus <i>Pseudomonas</i> and its extraordinary versatility	16
1.7 Solvent-tolerant microorganisms and the prime example: <i>Pseudomonas</i>	18
1.8 <i>Pseudomonas taiwanensis</i> VLB120, a solvent-tolerant production strain	21
1.9 Scope of this thesis.....	22
CHAPTER 2 - MAKING VARIABILITY LESS VARIABLE: MATCHING EXPRESSION SYSTEM AND HOST FOR OXYGENASE-BASED BIOTRANSFORMATIONS	25
2.1 Abstract.....	26
2.2 Introduction	27
2.3 Materials and methods.....	29
2.4 Results	33
2.5 Discussion.....	43
2.6 Conclusion.....	49
CHAPTER 3 - VARIABILITY IN SUBPOPULATION FORMATION PROPAGATES INTO BIOCATALYTIC VARIABILITY OF ENGINEERED <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>.....	51
3.1 Abstract.....	52
3.2 Introduction	53
3.3 Materials and methods.....	56
3.4 Results	62
3.5 Discussion.....	69
3.6 Conclusion.....	74
CHAPTER 4 - SOLVENT-TOLERANT <i>PSEUDOMONAS TAIWANENSIS</i> VLB120ΔC STRAINS EXHIBIT AN EXTRAORDINARY AND RELIABLE EPOXIDATION PERFORMANCE DEPENDING ON ENERGY SOURCE AVAILABILITY	75
4.1 Abstract.....	76
4.2 Introduction	77
4.3 Materials and methods.....	79
4.4 Results	85
4.5 Discussion.....	102

4.6	Conclusion	109
CHAPTER 5 - THE MULTIPLE ROLE OF CATABOLITE REPRESSION CONTROL DURING BIOCATALYTIC EPOXIDATION WITH CONSTITUTIVELY SOLVENT-TOLERANT <i>PSEUDOMONAS TAIWANENSIS</i> VLB120ΔCΔtgV.....		
		111
5.1	Abstract	112
5.2	Introduction.....	113
5.3	Materials and methods	117
5.4	Results.....	122
5.5	Discussion.....	134
5.6	Conclusion	143
CHAPTER 6 - GENERAL DISCUSSION		
		145
6.1	Methods and strategies to overcome cellular heterogeneity during biocatalysis	146
6.2	Process-level economic assessment of biocatalytic styrene epoxidation	158
CHAPTER 7 - CONCLUSION AND OUTLOOK.....		
		173
7.1	General Remarks.....	174
7.2	Clonal variability is highly interconnected to intra-population variability.....	174
7.3	Carbon source availability limits biotransformation efficiency	176
7.4	Gene overexpression and the consequences	178
7.5	Gluconate, a major bottleneck for <i>Pseudomonas</i> -based applications.....	179
7.6	Further strategies to improve biocatalytic (<i>S</i>)-styrene oxide production.....	180
7.7	Concluding Remarks	181
APPENDIX.....		
		183
REFERENCES.....		
		195
<i>Curriculum vitae</i>		
		217