

Marvin Kadisch

Stabilizing whole-cell biocatalysts

En route to more efficient fatty acid
methyl ester bioprocessing

Volume 28

**SHAKER
VERLAG**

STABILIZING WHOLE-CELL BIOCATALYSTS

—

EN ROUTE TO MORE EFFICIENT FATTY ACID METHYL ESTER
BIOPROCESSING

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer nat.

vorgelegt von

M. Sc. Marvin Kadisch

geboren am 14.03.1986 in Bremen

Dekan: Prof. Dr. Tilo Pompe

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schmid (Universität Leipzig)
Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg (RWTH Aachen)

Tag der Verteidigung 13.10.2017

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

Marvin Kadisch

Stabilizing whole-cell biocatalysts

En route to more efficient fatty acid methyl ester bioprocessing

Volume 28

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung/Universität Leipzig

Shaker Verlag
Aachen 2017

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., 2017

Copyright Shaker Verlag 2017

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 978-3-8440-5610-5

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

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Schmid für die Gelegenheit in diesem spannenden Forschungsfeld zu arbeiten. Danke Andreas dass du mir gezeigt hast, wie wichtig es ist immer die übergeordnete Ebene im Blick zu haben.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Prof. Dr. Bruno Bühler der mir alle wissenschaftlichen Freiheiten eingeräumt hat und immer die wichtigen Details im Blick behalten hat. Danke Bruno für die lehrreichen (nicht nur) fachlichen Diskussionen, deine Korrekturen und Anmerkungen zu meiner Arbeit und deine immer herzliche Art.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Ulrich Schwaneberg für die Begutachtung meiner Arbeit. Danke Uli, dass du mich auf meinem gesamten akademischem Weg begleitet und immer unterstützt hast.

Bei allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus Dortmund und Leipzig möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit bedanken. Ganz besonders danken möchte ich Michael, Mani und Christian. Danke Michael für die vielen Gespräche, besonders die fachfremden, und das gegenseitige Motivieren. Danke Mani für deine (geduldige) Einführung in die Welt der Zweiphasenbiotransformationen. Danke Christian für deinen Rat und deine Unterstützung, gerade zum Ende meiner Doktorarbeit, unseren besonderen Bürohumor und dein immer ehrliche Art.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie immer Anteil genommen und mich unterstützt haben. Danke!

Mein größter Dank aber gilt meiner Frau Anja. Danke Anja, dass du deine eigenen Ziele für mich hinten angestellt und mich durch alle guten und schlechten Phasen der Doktorarbeit begleitet hast. Danke dafür, dass du mit mir durch halb Deutschland gezogen bist und nebenbei noch unsere drei wunderbaren Kinder großgezogen hast. Ohne dich wäre dass alles nicht möglich gewesen und dafür bin ich dir für immer dankbar!

Für meine Familie

BIBLIOGRAPHIC DETAILS

Marvin Kadisch

Stabilizing whole-cell biocatalysts – *En route* to more efficient fatty acid methyl ester bioprocessing

Faculty of Biosciences, Pharmacy und Psychology

Leipzig University

Dissertation

208 pages, 385 referencens, 32 figures, 27 tables

Whole-cell biocatalysts offer great potential for the development of sustainable processes that are difficult to achieve chemically and can replace or complement traditional chemical and pharmaceutical processes. However, microbial cells are often not evolved for the production of industrially relevant compounds, as most of these compounds exert toxicity and therefore destabilize respective biocatalysts. In order to overcome limitations related to stability and to exploit the full potential of whole-cell biocatalysts, a concerted strategy, combining pathway, cellular, reaction, and process engineering, has to be pursued.

In this thesis, a microbial oxyfunctionalization reaction was selected as a model bioprocess system to understand the mechanisms that affect the stability of whole-cell biocatalysts in a bioprocess and to exemplarily show selective engineering approaches to overcome such stability influencing factors. Respective biocatalysts were based on *E. coli*, which were genetically modified to express *alkBGT* and *alkL* from *Pseudomonas putida* GPo1, encoding an alkane monooxygenase system and a hydrophobic outer membrane porin, respectively, and enabled the terminal oxyfunctionalization of renewable fatty acid methyl esters (FAMES). Biotransformation experiments with *E. coli* W3110, using dodecanoic acid methyl ester (DAME) as substrate, revealed growth restriction, low productivities, and side-product formation, emphasizing the necessity of a cellular engineering strategy. The selection of *E. coli* JM101 as a more robust host strain and the generation of knockout variants, targeting a host-intrinsic esterase, enhanced the production of oxyfunctionalized DAME (~28%) and reduced the accumulation of hydrolyzed side-products (~75%). Substrate toxicity was identified as a key constraint that limits growth of whole-cell biocatalysts and DAME biotransformation. DAME belongs to the group of medium- to long-chain length FAMES. For these compounds, the outer membrane of microbes presents a natural barrier. Expression of *alkL* facilitated DAME uptake, but simultaneously induced biocatalyst toxification. A cellular engineering approach, making use of different constitutive promoters, was pursued to fine-tune *alkL* expression levels. Low *alkL* expression levels eventually set the basis for a stable whole-cell DAME biotransformation process. In combination with reduced *alkBGT* expression, this led to an oxyfunctionalized FAME titer of $76 \text{ g L}_{\text{tot}}^{-1}$ and a productivity of $12.9 \text{ g L}_{\text{aq}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

The described strategies based on cellular, pathway and reaction engineering levels are complementary to and can be combined with process engineering strategies to design stable bioprocesses based on living cells. Importantly, the presented strategies applied for the production of polymer building blocks from renewable feedstocks are not exclusive to the model system, but can be transferred to other bioprocesses employing metabolic engineering-derived whole-cell biocatalysts.

TABLE OF CONTENTS

ACKNOWLEDGEMENTS.....	I
TABLE OF CONTENTS.....	IX
SUMMARY	XIII
ZUSAMMENFASSUNG	XV
LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	XVIII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 PREFACE.....	2
1.2 INTRODUCTION.....	3
1.3 BASIC FACTORS DETERMINING WHOLE-CELL BIOCATALYST STABILITY	5
1.4 SCOPE OF THE THESIS	35
2 HYDROLASE BIOH KNOCKOUT IN <i>E. COLI</i> ENABLES EFFICIENT FATTY ACID METHYL ESTER BIOPROCESSING.....	37
2.1 ABSTRACT.....	38
2.2 INTRODUCTION.....	39
2.3 MATERIALS & METHODS	41
2.4 RESULTS.....	44
2.5 DISCUSSION.....	53
2.6 CONCLUSION	58
2.7 ACKNOWLEDGEMENTS	58
3 CONSTITUTION OF THREE-COMPONENT MONOOXYGENASE ALKBGT IN RECOMBINANT WHOLE-CELL BIOCATALYSTS DETERMINES EFFICIENCY OF RENEWABLE DODECANOIC ACID METHYL ESTER OXYFUNCTIONALIZATIONS.....	59
3.1 ABSTRACT.....	60

3.2 INTRODUCTION	61
3.3 MATERIALS & METHODS	63
3.4 RESULTS.....	69
3.5 DISCUSSION	79
3.6 CONCLUSION	84
3.7 ACKNOWLEDGEMENTS	84
4 MAXIMIZATION OF CELL VIABILITY RATHER THAN BIOCATALYST ACTIVITY IMPROVES WHOLE-CELL Ω- OXYFUNCTIONALIZATION PERFORMANCE	85
4.1 ABSTRACT.....	86
4.2 INTRODUCTION.....	87
4.3 MATERIALS & METHODS	89
4.4 RESULTS.....	93
4.5 DISCUSSION	103
4.6 CONCLUSION	108
4.7 ACKNOWLEDGEMENTS	108
5 EXPLOITING REACTION KINETICS FOR SELECTIVE ALDEHYDE FORMATION BY MEANS OF MIXED CULTURE BIOTRANSFORMATIONS OF RENEWABLE DODECANOIC ACID METHYL ESTER.....	109
5.1 ABSTRACT.....	110
5.2 INTRODUCTION	111
5.3 MATERIALS & METHODS	114
5.4 RESULTS.....	117
5.5 DISCUSSION.....	127
5.6 CONCLUSION	130
5.7 ACKNOWLEDGEMENTS	131

6 GENERAL DISCUSSION.....	133
6.1 STABILITY LEVELS <i>VERSUS</i> OBJECTIVE FUNCTION	134
6.2 STABILIZING WHOLE-CELL BIOCATALYSTS FOR EFFICIENT TERMINAL OXYFUNCTIONALIZATION OF DAME	140
6.3 INTEGRATING SYNTHETIC BIOLOGY, SYSTEMS BIOTECHNOLOGY, AND REACTION/ PROCESS ENGINEERING STRATEGIES	143
7 CONCLUSIONS & OUTLOOK	145
7.1 IMPLICATIONS FOR BIOPROCESS DEVELOPMENT AND CONCLUSION	146
8 REFERENCES.....	151
9 APPENDIX	179
9.1 SUPPLEMENTARY TABLE	180
9.2 SUPPLEMENTARY FIGURES	181
10 CURRICULUM VITAE.....	183

SUMMARY

Whole-cell biocatalysts offer great potential for the development of sustainable processes that are difficult to achieve chemically and can replace or complement traditional chemical and pharmaceutical processes. However, microbial cells are not evolved for the production of industrially-relevant compounds, which often exert toxicity and therefore destabilize whole-cell biocatalysts. In order to overcome limitations related to stability and to exploit the full potential of whole-cell biocatalysts, a concerted strategy combining pathway, cellular, reaction, and process engineering has to be pursued.

In this thesis, a microbial oxyfunctionalization reaction was selected as a model bioprocess system to understand the mechanisms that affect the stability of whole-cell biocatalysts in a bioprocess and to exemplarily show selective engineering approaches to overcome such stability influencing factors. Respective biocatalysts were based on genetically modified *E. coli* containing the alkane monooxygenase system AlkBGT and the outer membrane protein AlkL from *P. putida* GPo1, enabling oxyfunctionalization of renewable fatty acid methyl esters (FAMEs).

Biotransformation experiments with *E. coli* W3110 using dodecanoic acid methyl ester (DAME) as substrate revealed growth restriction, low productivities, and side-product formation, emphasizing the necessity of a cellular engineering strategy. The selection of *E. coli* JM101 as a more robust host strain and the generation of knockout variants, targeting a host-intrinsic esterase, enhanced the production of oxyfunctionalized DAME (by ~28%) and reduced the accumulation of hydrolyzed side-products (by ~75%).

This and other whole-cell biocatalysts rely on heterologous gene expression. In general, gene overexpression competes with carbon and energy fluxes required for cellular maintenance and growth. In particular, oxygenases can also induce cellular stress and destabilization by the formation of reactive oxygen species and/or the overoxidation of products, as reported for the alkane monooxygenase complex AlkBGT composed of the oxygenase subunit AlkB and the electron transfer system consisting of rubredoxin AlkG and rubredoxin reductase AlkT. With the goal to decrease uncoupling and stabilize recombinant hosts, the subunit ratio was modulated. Biocatalysts featuring moderate reduction in the AlkT protein content showed ~25% higher initial specific activities, while further reduction in the AlkT protein content reduced product overoxidation by ~85% in comparison to the original protein ratios. During biotransformations, biocatalysts with moderately reduced AlkT levels profited from superior

process stability leading to a >2-fold increase of product concentrations up to 93.3 mM of oxyfunctionalized DAME derivatives.

Substrate toxicity was identified as a key constraint that limits growth and performance of whole-cell biocatalysts during DAME biotransformations. DAME belongs to the group of medium chain-length FAMEs. For these compounds, the outer membrane of microbes presents a natural barrier. Introduction of the hydrophobic outer membrane porin AlkL facilitated DAME uptake, but simultaneously induced biocatalyst toxification. A cellular engineering approach making use of different constitutive promoters was pursued to fine-tune AlkL expression levels. Low AlkL levels eventually set the stage for a stable and efficient whole-cell DAME biotransformation process. In combination with reduced *alkBGT* expression, this enabled an oxyfunctionalized FAME titer of 76 g L_{tot}⁻¹ and a productivity of 12.9 g L_{aq}⁻¹ h⁻¹.

Selective formation of the aldehyde 12-oxo-dodecanoic (ODAME) acid from DAME has been promoted via the incorporation of the alcohol dehydrogenase (AlkJ) into the recombinant whole-cell biocatalyst. However, simultaneous overexpression of *alkBGT*, *alkL*, and *alkJ* in a single recombinant host triggered a metabolic burden response resulting in reduced growth rates and biocatalyst stabilities. Also, AlkJ protein levels have been found insufficient to drive ODAME formation. Therefore, biocatalyst engineering was combined with reaction engineering in this study, that is, *alkBGT* and *alkJ* expression loads were distributed on two separate *E. coli* hosts, which enabled easily tunable AlkBGT:AlkJ protein ratios. This mixed culture approach reduced the burden of recombinant protein synthesis for the individual strains and finally enabled selective ODAME formation in a growing whole-cell biotransformation process.

The described strategies based on cellular, pathway, and reaction engineering are complementary to and can be combined with process engineering strategies to design stable whole-cell biocatalysts and bioprocesses. Importantly, the presented strategies applied for the production of polymers building blocks from renewable feedstocks are not exclusive to the model system but can be transferred to other bioprocesses employing metabolic engineering-derived whole-cell biocatalysts.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ganzzellbiokatalyse bietet großes Potenzial zur Entwicklung nachhaltiger Produktionsprozesse, die chemisch nicht abgebildet werden können und traditionelle chemische und pharmazeutische Prozesse ergänzen oder sogar ersetzen können. In der Regel sind mikrobielle Zellen jedoch nicht für die Herstellung von industriell relevanten Verbindungen evolviert, da diese Verbindungen häufig toxische und damit auf den Ganzzellbiokatalysatoren destabilisierende Wirkungen zeigen. Um Limitationen bezüglich der Biokatalysatorstabilität zu überwinden und das volle Potenzial der Biokatalysatoren auszuschöpfen, sind konzentrierte Optimierungsstrategien auf verschiedenen Ebenen notwendig. Hierbei ist die kombinierte Abstimmung der Stoffflüsse, die Anpassung der Zelle als Biokatalysator, sowie die Auswahl geeigneter Reaktions- und Prozesstechniken von besonderer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und der Charakterisierung von Mechanismen, die auf die Stabilität von Ganzzellbiokatalysatoren wirken. Zur exemplarischen Betrachtung ausgewählter Entwicklungsstrategien diente die mikrobielle Oxyfunktionalisierung von erneuerbaren Fettsäuremethylestern als modellhafter Bioprozess. Der eingesetzte Ganzzellbiokatalysator, basierend auf *E. coli*, wurde für die Expression der Alkanmonooxygenase AlkBGT und des Membranproteins AlkL aus *Pseudomonas putida* GPo1 entsprechend genetisch modifiziert.

Biotransformationsexperimente mit rekombinanten *E. coli* W3110 als Biokatalysator und Laurinsäuremethylester (LSME) als Substrat führte zu stark reduziertem Wachstum des Biokatalysators, geringer Produktivität und hoher Nebenproduktbildung. Dies verdeutlichte die Notwendigkeit einer Stammentwicklungsstrategie. Der Wechsel zum robusteren Produktionsstamm *E. coli* JM101 und die Erzeugung von Knock-out Varianten einer Host-intrinsischen Esterase führte schließlich zur Erhöhung des Titors von oxyfunktionalisiertem LSME (~28%) und zu reduzierter Akkumulierung hydrolysierter Nebenprodukte (~75%).

Diese und andere Ganzzellbiokatalysatoren beruhen auf der heterologen Genexpression und der Proteinsynthese. Im Allgemeinen konkurriert die Überexpression von Fremdgenen mit Kohlenstoff- und Energieflüssen, die für das Zellwachstum und die Zellregenerierung erforderlich sind. Speziell die Expression von Oxygenasen kann außerdem zu Zellstress und Biokatalysatorinstabilität durch reaktive Sauerstoffspezien und/oder die Überoxidation von Produkten führen. Beschrieben wurde dieser Effekt auch für die Alkanmonooxygenase

AlkBGT bestehend aus einer katalytischen Untereinheit (AlkB) und dem Elektronentransfersystem, dem Rubredoxin (AlkG) und der Rubredoxinreduktase (AlkT). Zur Vermeidung dieser destabilisierenden Effekte, wurde eine Entwicklungsstrategie verfolgt, welche die Optimierung der Proteinverhältnisse innerhalb des Monooxygenase-Enzymkomplexes AlkBGT betrachtet. Ganzzellbiokatalysatoren mit moderat reduzierter AlkT Proteinkonzentration erreichten eine ~25% höhere spezifische Anfangsaktivität und profitierten von einer erhöhten Prozessstabilität bezüglich der LSME Biotransformation mit >2x höheren Titern oxyfunktionalisierter LSME (93,3 mM). Eine weitere Reduzierung der AlkT Proteinkonzentration verringerte zudem die Produktüberoxidation um ~85%.

Substrattoxizität wurde als einer der wichtigsten Schlüsselfaktoren identifiziert, welcher sowohl negativen Einfluss auf das Biokatalysatorwachstum, wie auch auf die Produktbildung in LSME Biotransformationen hatte. LSME gehört zur Gruppe der mittellangkettigen Fettsäuremethylester. Für diese Verbindungen stellt die äußere Membran der Mikroorganismen eine natürliche Barriere dar. Durch die Expression des Membranproteins AlkL wird die Aufnahme von LSME deutlich erhöht, was jedoch auch eine Toxifizierung des Biokatalysators induziert. Im Zuge einer Zellentwicklungsstrategie wurde die Expression des AlkL Membranproteins, basierend auf konstitutiven Promotervarianten, reduziert und bildete damit die Grundlage für stabile LSME Ganzzellbiotransformationen. In Kombination mit reduzierter AlkBGT Expression, führte dies schließlich zu einer Verfielfachung des Titers oxyfunktionalisierter Fettsäuremethylester auf $76 \text{ g L}_{\text{tot}}^{-1}$ und einer erhöhten Produktivität auf $12,9 \text{ g L}_{\text{aq}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Um die selektive Bildung des Aldehyds 12-Oxolaurinsäure (OLSME) aus LSME zu forcieren, wurde im Zuge einer Entwicklungsstrategie bezüglich der Elektronenflüsse die Alkohol-Dehydrogenase AlkJ in den rekombinanten Ganzzellbiokatalysator eingebracht. Die simultane Überexpression von *alkBGT*, *alkL* und *alkJ* in einem einzelnen rekombinanten Wirt induzierte eine metabolische Belastungsreaktion, die sich in einer deutlich reduzierte Wachstumsrate widerspiegelte. Des Weiteren war die AlkJ Proteinkonzentration nicht ausreichend um die selektive OLSME Bildung zu ermöglichen. Als weiterführende reaktionstechnische Entwicklungsstrategie, wurde die Expressionslast auf zwei separate *E. coli* Wirte aufgeteilt und die Verteilung der AlkBGT:AlkJ Proteinverhältnisse in diesen Mischkulturen angepasst. Die reduzierte Last der heterologen Proteinsynthese ermöglichte schließlich die selektive Bildung von OLSME in einem Ganzzellbiokatalyseprozess mit wachsenden Zellen.

Die beschriebenen Strategien wirken auf der Ebene der Zelle, der Stoffflüsse und der Reaktion und können mit Strategien aus der Verfahrenstechnik ergänzt, sowie kombiniert werden um stabile Ganzzellbiokatalysatoren und Bioprozesse zu entwickeln. Insbesondere gelten die vorgestellten Strategien zur Herstellung von Polymerbausteinen aus nachwachsenden Rohstoffen nicht exklusiv für dieses Modellsystem, sondern können auf jegliche Bioprozesse, die auf den Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren basieren, übertragen werden.

LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

2-LP	Two-liquid phase
3-HP	3-hydroxypropionic acid
μ	Specific growth rate
ω -TA	ω -transaminase
aq	aqueous
ADAME	12-aminododecanoic acid methyl ester
ADA	12-aminododecanoic acid
AlkB	alkane monooxygenase
AlkG	rubredoxin
AlkJ	alcohol dehydrogenase
AlkL	outer membrane protein
AlkS	regulator
AlkT	rubredoxin reductase
AOX	alternative oxidase
ATP	adenosine triphosphate
BioH	pimeloyl-CoA esterase
BMP2	bone morphogenetic protein-2
CDW	cell dry weight
CICHe	chemically inducible chromosomal evolution
CMC	critical membrane concentration
CYP	cytochrome P450
DAME	12-dodecanoic acid methyl ester
DCA	α,ω -dicarboxylic acid
DCPK	dicyclopropyl ketone
DDA	12-dodecanedioic acid
DDAME	12-dodecanedioic acid methyl ester

DINP	diisononylphtalate
DOT	dissolved oxygen tension
FA	fatty acids
FAME	fatty acid methyl ester
HPLC	high-performance liquid chromatography
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
hsp	heat shock protein
IBE	isobutanol, butanol, ethanol
IS	insertion sequences
ISPR	in-situ product removal
ISSS	in-situ substrate supply
k_{cat}	catalytic constant [s^{-1}]
K_M	Michaelis dissociation constant [$mol_{substrate} L^{-1}$]
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
LB	Luria-Bertani
$\log P_{O/W}$	partition coefficient in octanol/water mixtures
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
N/C	nitrogen/carbon
NOX	NADH oxidase
OD ₄₅₀	optical density at 450 nm
org	organic
pDNA	plasmid DNA
PDO	1,3-propanediol
PDOR	1,3-propanediol oxidoreductase
PoPQC	population quality control

(p)ppGpp	guanosin tetra- or pentaphosphate
RCA	resting-cell assay
ROS	reactive oxygen species
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIP	stable-isotope probing
SMO	styrene monooxygenase
SSR	simple sequence repeat
STR	stirred-tank reactor
STY	space-time-yield
TN	turnover number
TRAIL	tumor necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand
TTN	total turnover number
ODAME	12-oxododecanoic acid methyl ester
U	units [$\mu\text{mol}_{\text{product}} \text{min}^{-1}$]
V_{max}	maximum reaction velocity [$\text{U g}_{\text{CDW}}^{-1}$]
v/v	volume/volume [%]
vvm	volume volume ⁻¹ min ⁻¹
w/v	weight/volume [%]
wt	wildtype