

Magdalena Mock

**Photoautotrophic production
of succinate using
Synechocystis sp. PCC 6803**

Volume 32

**SHAKER
VERLAG**

Photoautotrophic production of succinate using
***Synechocystis* sp. PCC 6803**

Von der Fakultät Maschinenwesen
der Technischen Universität Dresden
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

(Dr.-Ing.)

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Magdalena Mock

geboren am 14.10.1986 in Herten

Gutachter: Prof. Dr. Katja Bühler (Technische Universität Dresden)
Prof. Dr. Lars Blank (RWTH Aachen)

Tag der Verteidigung: 18.06.2019

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

Magdalena Mock

**Photoautotrophic production of succinate
using *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Volume 32

Shaker Verlag
Düren 2020

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.: Dresden, Techn. Univ., Diss., 2019

Copyright Shaker Verlag 2020

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 978-3-8440-7123-8

ISSN 1868-0283

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Phone: 0049/2421/99011-0 • Telefax: 0049/2421/99011-9

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

Danksagung

Zu allererst möchte ich meiner betreuenden Professorin Katja Bühler für die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit danken. Sie hat mich in den letzten vier Jahren in ihrer Arbeitsgruppe immer unterstützt und war auch in stressigen Phasen jederzeit für Fragen und Diskussionen erreichbar.

Weiterhin gilt mein Dank unserem Departmentleiter Professor Andreas Schmid, der mir zusammen mit Katja die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit im Department Solare Materialien am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung in Leipzig anzufertigen. Neben seiner Aufgabe als Departmentleiter hat er mich in meiner Forschung durch inspirierende Vorschläge in unseren Seminaren und Gesprächen unterstützt.

Für die Bereitschaft meine Dissertation als Gutachter zu bewerten möchte ich mich ausdrücklich bei Professor Lars Blank von der RWTH Aachen bedanken.

Weiterhin danke ich der Südzucker AG für die finanzielle Unterstützung und die stets gute Zusammenarbeit, speziell Herrn Dr. Wolfgang Wach und Frau Edda Höfer.

Mein besonderer Dank geht an Anna, Linde, Christian W., Düse, Mani und Marcel, die in den letzten Jahren zu engen Freunden geworden sind. Danke für die schönen Abende, die guten Gespräche und eine unvergessliche Zeit! Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen (ehemaligen) SoMa-Kollegen (Anja, Babu, Bin, Bruno, Carolin, Caroline, Christian D., Diego, Eleni, Fabian, Heiko, Inge, Jenny, Jens K., Jens A., Jochen, Jörg, Kamila, Karolin, Katrin, Kerstin, Kristin, Lisa, Mahir, Martin L., Martin S., Marvin, Michael, Olli, Paul, Peter, Rohan, Ron, Samuel, Sebastian, Stephan, Verena, Vu) für die gute Zusammenarbeit und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein zusätzliches Dankeschön geht an Stephan, der mir mit vielen wertvollen Tipps geholfen hat und ein sehr angenehmer Bürokollege war. Außerdem möchte ich mich bei meinem Studenten Benno bedanken, der durch seine Arbeit zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, bei meiner Schwester und allen anderen Familienmitgliedern. Ihr habt mich sowohl während meines Studiums als auch während der Promotion immer unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meinem lieben Tobias. Danke, dass du immer für mich da gewesen bist, mir den Rücken frei gehalten hast und dass die 454 km zwischen Leipzig und Gelsenkirchen kein Problem für uns waren. Vielen Dank Euch allen!

Table of Contents

Danksagung	I
Zusammenfassung.....	V
Abstract	VI
List of abbreviations	VII
1 Introduction	1
1.1 Biotechnology	2
1.2 Cyanobacteria as photoautotrophic biocatalysts	3
1.3 Cyanobacterial TCA cycle	9
1.4 The ethylene-forming enzyme	11
1.5 Succinate and the succinate dehydrogenase.....	13
1.6 Planktonic cultivation of cyanobacteria.....	16
1.7 Photoautotrophic biofilms for continuous cultivation	18
1.8 Scope of the thesis	21
2 Materials and methods	23
2.1 Chemicals	24
2.2 Bacterial strains, plasmids, and primers	24
2.3 Molecular biology methods	27
2.4 Cultivation of microbial strains	30
2.5 Cultivation of <i>Synechocystis</i> in a flat panel photobioreactor	31
2.6 Analytical methods.....	32
2.7 Ethylene production assay	37
3 Results	39
3.1 Biocatalyst design and proof of concept.....	40
3.2 Identification of bottlenecks during cultivation of <i>Synechocystis</i> Δ <i>sll1625</i>	43
3.3 Deletion of the SDH influences cell physiology	49
3.4 Impact of the ethylene forming enzyme on the formation of succinate	57
4 Discussion.....	65
4.1 Metabolic engineering of <i>Synechocystis</i>	66
4.2 Strain development – differences of SDH subunits	67

4.3	Knockout of <i>sll1625</i> influences cell physiology and redirects the intracellular carbon flux.....	68
4.4	Photoautotrophic production of succinate via the oxidative branch of the TCA cycle.....	71
4.5	Cyanobacterial routes towards succinate.....	75
4.6	Impact of the ethylene forming enzyme on the formation of succinate	80
4.7	Scalability and future potential of the process.....	83
5	Concluding remarks and outlook	87
6	Appendix	91
7	References.....	99
	<i>Curriculum vitae</i>	109

Zusammenfassung

Heutzutage basieren fast alle industriellen biotechnologischen Prozesse auf heterotrophen Mikroorganismen. Da diese allerdings auf Rohstoffe wie beispielsweise Mais und Zuckerrohr als Kohlenstoffquelle angewiesen sind, ist die Nachhaltigkeit der Prozesse fragwürdig. Daher wird immer häufiger die Nutzung von CO₂ als preisgünstige und abundant vorhandene Kohlenstoffquelle in Betracht gezogen.

Cyanobakterien sind photoautotrophe Mikroorganismen. Sie betreiben Photosynthese und sind somit in der Lage CO₂ aus der Atmosphäre zu fixieren. In den letzten Jahren sind Cyanobakterien stark in den Fokus der biotechnologischen Forschung gerückt. Obwohl es inzwischen zahlreiche Konzeptstudien gibt, fehlt ein tiefergehendes Verständnis dieser Organismen. Dies ist zwingend erforderlich um Cyanobakterien gezielt zu mikrobiellen Katalysatoren zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurde der cyanobakterielle Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die photoautotrophe Produktion von Succinat genutzt. Bei Succinat handelt es sich um ein Intermediat des TCA Zyklus, welcher in *Synechocystis* noch nicht vollständig verstanden ist. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz basiert auf der Deletion der Succinat-Dehydrogenase und somit auf der Akkumulation von Succinat über den oxidativen Arm des TCA Zyklus. Unter den vier verschiedenen Deletionsmutanten zeigte *Synechocystis* Δ sl1625 die höchsten Titer an Succinat. Nach Anpassung der Kultivierungsbedingungen konnte eine Succinatkonzentration von 480 mg L⁻¹ erzielt werden. Um den Kohlenstofffluss durch den TCA Zyklus zu erhöhen, wurde zusätzlich das Gen des „Ethylene-forming Enzyme“ exprimiert. In Kombination mit der Kultivierung in 5fach konzentriertem Medium konnte so ein maximaler Succinattiter von 770 mg L⁻¹ erreicht werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Deletion der Succinat-Dehydrogenase bei erhöhten CO₂ Konzentrationen die Zellzahlen, Zellvolumina sowie die Akkumulation des intrazellulären Speicherstoffs Glykogen stark beeinflusst.

Auf Basis der erzielten Ergebnisse wurde die photoautotrophe Produktion von Succinat unter ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten evaluiert. Dabei zeigte sich, dass Cyanobakterien durchaus das Potential haben in nachhaltigen biotechnologischen Prozessen eingesetzt zu werden, allerdings erfordert dies noch eine Vielzahl an Optimierungen. Weiterhin wurde gezeigt, dass genetische Modifikationen einen großen Einfluss auf die Zellphysiologie haben können.

Abstract

To date, nearly all established biotechnological processes are based on heterotrophic organisms. However, these processes depend on organic carbon-based feedstocks like corn or sugarcane and sustainability is questionable. As an alternative, the use of CO₂ as a cheap and especially abundant inorganic carbon source needs to be considered. Cyanobacteria as photoautotrophic organisms are capable of performing photosynthesis and fix CO₂ from the atmosphere. In addition, they only need water and sunlight as an energy source. During the last years, cyanobacteria gained more and more interest as biocatalysts for the production of value-added compounds. Although a lot of proof-of-concept studies exist, a deeper understanding of these microbes is necessary to realize rational engineering strategies for the development of cyanobacterial workhorses.

In this study the cyanobacterial model organism *Synechocystis* sp. PCC 6803 was utilized for the photoautotrophic production of succinate. Succinate is an intermediate of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) and this part of the central carbon metabolism is not yet fully understood in *Synechocystis*. However, deletion of the succinate dehydrogenase resulted in the accumulation of succinate via the oxidative branch of the TCA cycle. Four different knockout mutants were created and *Synechocystis_Δsll1625* was identified as the best performing strain regarding succinate production. An adaptation of the cultivation conditions resulted in a final succinate titer of 480 mg L⁻¹. The additional expression of the gene coding for the ethylene-forming enzyme combined with the cultivation in 5times concentrated medium increased the maximal succinate titer to 770 mg L⁻¹. Furthermore, a substantial effect on the cell physiology after the deletion of the succinate dehydrogenase was revealed. At elevated concentrations of CO₂, the cell number in cultures of the knockout mutant was significantly reduced, while the cell volume and the intracellular accumulation of the storage compound glycogen were increased.

It was shown, that succinate can be produced directly from CO₂ and that cyanobacteria have the potential to be applied in sustainable biotechnological processes. However, also the current bottlenecks for industrial applications were highlighted. Furthermore, it was shown that genetic manipulations can have a significant impact on the cell physiology and that these impacts need to be analyzed and understood to identify appropriate approaches to further improve cyanobacterial biocatalysts.

List of abbreviations

ACC	1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ANOVA	Analysis of variance
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
C/N ratio	Carbon to nitrogen ratio
CBB	Calvin-Benson-Bassham
CDW	Cell dry weight
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRISPRi	CRISPR interference
dCas	Nuclease-deficient Cas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFE	Ethylene-forming enzyme
EPS	Extracellular polymeric substances
ETC	Electron transport chain
FID	Flame ionization detector
FPR	Flat panel reactors
GABA	γ -Aminobutyric acid
GC	Gas chromatography
GOI	Gene of interest
HDR	Homology-directed repair
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
ICL	Isocitrate lyase
KMBA	2-Keto-4-methylthiobutyric acid
MDH	Malate dehydrogenase
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), reduced
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized
NHEJ	Non-homologous end joining
OD _{750/450}	Optical density at 750/450 nm
ORF	Open reading frame
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PAR	Photosynthetically active radiation

PCR	Polymerase chain reaction
PTV	Programmed temperature vaporizing
RBS	Ribosomal binding site
REACH	Registration, evaluation, authorization, and restriction of chemicals
RI	Refractive index
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDH	Succinate dehydrogenase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
STR	Stirred-tank reactor
SWH	Sequence without homology
<i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle
TRL	Technology readiness level