

APPLIED MICROBIOLOGY

Volume 7

Jannis Küpper

Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the production of aromatics from glucose



**„Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the production of
aromatics from glucose“**

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University vorgelegte Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften

vorgelegt von

Diplom Ingenieur

Jannis Küpper

aus

Essen, Nordrhein-Westfalen, Deutschland

Berichter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Lars M. Blank

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Marco Oldiges

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2017

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Jannis Küpper:

Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the production of aromatics from glucose“

1. Auflage, 2018

Gedruckt auf holz- und säurefreiem Papier, 100% chlorfrei gebleicht.

Apprimus Verlag, Aachen, 2018

Wissenschaftsverlag des Instituts für Industriekommunikation und Fachmedien an der RWTH Aachen

Steinbachstr. 25, 52074 Aachen

Internet: www.apprimus-verlag.de, E-Mail: info@apprimus-verlag.de

ISBN 978-3-86359-649-1

D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2017)

Acknowledgements

First of all, I would like to thank you, Lars, for giving me the opportunity to do my Ph.D. under your supervision. Thank you very much for all your support and scientific guidance throughout the last years. It was an honor to be part of a great team making the move from Dortmund to Aachen together and setting the foundation of the iAMB. It fills me with pride to see how far the iAMB has come under your leadership.

Second, I would like to thank you Nick for your outstanding support, exceptional scientific expertise and your patience to open my engineering mind to the wonderful world of molecular biotechnology. You definitely always walked the extra mile to build scientific knowhow and character in a challenging environment. Dank je wel for not only being the best supervisor but also for becoming a true friend.

Moreover, I would like to thank Prof. Marco Oldiges for being my second reviewer.

I also would like to express my gratitude to the many project partners that have contributed to this research and that have accompanied me throughout my Ph.D.. Thank you so much for great collaboration, many fruitful scientific discussion, your extensive scientific knowhow and outstanding project meetings. Namely I would like to mention the members of the ERA-IB project "Pseudomonas 2.0" Prof. Andreas Schmid, Dr. Bruno Bühler, Dr. Martin Lindmeyer, Dr. Jan Volmer, Prof. Ralf Takors, Dr. Martin Siemann-Herzberg, Dr. Sarah Lieder, Prof. Susann Müller, Dr. Michael Jahn, Prof. J. Han de Winde, Dr. Harald Ruijsenaars, Prof. Bruno Zelić, Nikola Pandurić, Prof. Victor de Lorenzo, Dr. Pablo I. Nikel, Dr. Günter

Pappenberger and Hans-Peter Hohmann, and Dr. Swantje Behnken and Dr. Gernot Jäger.

In addition, I would like to express my gratitude to all my colleagues at the iAMB. Alana, Annette, Bastian, Benedikt, Bernd, Birgitta, Brehmi, Christoph H., Christoph L., Christoph T., Dario, Eda, Elena, Elke, Elvira, Erick, Frank, Gisela, Hamed, Henrik, Ivan, Jan F., Jan S., Kalle, Kerstin, Manja, Mathias, Miriam, Rabea, Salome, Sandra P., Sandra S., Sebastian, Simone, Suresh, Tatiana, Theresa, Thiemo, Thomas, Till, Ulrike, Ute, Wei, Wing-Jin, and Yulei it was a pleasure working with you. You all made this life phase unforgettable.

Moreover, I would like to thank Sebastian Zobel for being an awesome co-author, co-worker, office mate, roommate and friend.

I am especially thankful for all my students, Maike Otto, David Wenninger, Jasmin Dickler, Jan Ide, Michael Biggel and Andreas Pint. Maike, I am honored that you are continuing some of our work within your Ph.D..

Furthermore, I would like to thank the members of the two workshops which were extremely supportive in setting up the iAMB and who enable us to do our research. Thank you for making things work Peter, Rolf, Manni, Günther, Tim, Udo and Tom.

A very special “thank you” goes to my family without your continuous support none of this would have been possible. No words are enough to express my gratitude to you my parents Annette and Jens and my sister Kerstin, Oma Ilse and Opa August, Oma Inge and Opa Horst, Hans and Norbert, Susanne and Gerd, you are always there for me.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my wonderful fiancée, you are truly amazing. Thank you for your endless, loving support and your belief in me and us and your patience. Your love and support kept me strong throughout my Ph.D..

Funding



This work was partially funded through the European Research Area Industrial Biotechnology (ERA-IB) Project “Pseudomonas 2.0”. The ERA-IB is an ERA-NET funded by the European Commission's sixth Framework Programme (FP6). Pseudomonas 2.0 major focus was to develop pseudomonads as a platform host for industrial Biotechnology.

Summary

Within the last century a highly optimized petro based chemical industry emerged which produces a vast array of chemical products with applications in every area of our life. The extensive exploitation of the non-renewable, fossil resources raised concerns due to the finitude of these resources, the rising production costs, greenhouse gas emissions and constantly increasing waste streams add to climate change, which poses a severe threat to the environment and ultimately humanity. In addition to these concerns, political drivers such as national energy independency and CO₂ taxation created a need for a more sustainable greener society and chemical industry with a lower carbon footprint. Fueled by renewable feedstocks and powered from wind, sun, water and biomass the bioeconomy produces biobased chemicals with potentially closed carbon balances and thus has the potential to create a truly sustainable chemical industry. Recent advances in the biological sciences provide the tools for targeted engineering, which accelerates the application of bioprocesses in the chemical industry. This dissertation focused on the investigation of pseudomonads, a promising microbial host for the bioeconomy with industrial relevant features such as solvent tolerance and a versatile metabolism. The complete genome of *Pseudomonas putida* S12 was published within the frame of this dissertation offering valuable genetic insights into this solvent tolerant strain to boost its application for the production of industrially relevant chemicals. Specific attention was paid to insertion sequences highlighting the importance of genome mobility for the engineering of stable production strains for the bioeconomy. In addition, the production of building blocks, namely styrene and anthranilate (oAB), which

serve as precursors for a variety of bulk and high value products, was realized in pseudomonads. Targeted metabolic pathway engineering strategies were investigated to increase precursor availability, to prohibit product degradation and to ultimately increase production titers. A maximal titer of 11.23 mM oAB and a maximal titer of 4.6 mM of styrene, and thus a second phase concentration of styrene, were achieved in pseudomonads highlighting their application as a platform host for a biobased chemical industry.

Zusammenfassung

Im Verlauf des letzten Jahrhunderts entwickelte sich eine hoch effiziente petrochemische Industrie, die ein breites Spektrum an chemischen Produkten für vielfältige Anwendungen in allen Bereichen unseres Lebens zur Verfügung stellt. Mit der intensiven Ausbeutung von fossilen, nicht erneuerbaren Rohstoffen rücken die negativen Folgen wie die Endlichkeit der fossilen Rohstoffe und damit verbundene steigende Produktionskosten, der Ausstoß von Treibhausgasen und eine ständig steigende Abfalllast, die zu einem menschengemachten Klimawandel führen, der die Umwelt aber auch die menschliche Existenz auf dem Planeten Erde bedroht, immer mehr in den Vordergrund. Des Weiteren rufen Bestrebungen zur nationalen Energieunabhängigkeit von den politisch instabilen ölproduzierenden Ländern und CO₂-Besteuerung ein politisch motiviertes Umdenken in der chemischen Industrie hin zu „grünere“ Produktionsprozessen mit niedrigerem CO₂-Ausstoß hervor. Eine durch erneuerbare Energien, wie Wind, Wasser, Sonne und Biomasse, angetriebene Bioökonomie produziert biobasierte Chemikalien mit potentiell geschlossenen Kohlenstoffbilanzen und kann somit zu einer echten nachhaltigen chemischen Industrie beitragen. Neuste Erkenntnisse in den biologischen Wissenschaften stellen die Basis für eine zielgerichtete Entwicklung von Biokatalysatoren und Bioprozessen dar, die ihre Verwendung in der chemischen Industrie beschleunigen. In dieser Doktorarbeit wurde der Fokus auf die Erforschung von Pseudomonaden, eine sehr vielversprechende Spezies für die Bioökonomie mit industriell relevanten Eigenschaften, wie Lösungsmitteltoleranz und ein vielseitiger Metabolismus, gelegt. Das vollständige Genom von *Pseudomonas putida* S12 wurde im Rahmen

dieser Doktorarbeit veröffentlicht und stellt wertvolle Einblicke in das Genom dieses lösungsmitteltoleranten Stammes zur Verfügung, um so die Verwendung für die Produktion von industriell relevanten Chemikalien zu erhöhen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Insertionssequenzen gelegt, da diese großen Einfluss auf die genomische Stabilität haben, was eine wichtige Voraussetzung für industrielle Produktionsstämme der Bioökonomie ist. Des Weiteren wurde die mikrobiologische Produktion von den Basischemikalien Styrol und Anthranilat (oAB), die als Grundstoffe zur Produktion von Fein- und Massenchemikalien verwendet werden, in Pseudomonaden realisiert. Zielgerichtete Änderungen im metabolischen Netzwerk wurden untersucht, um die Verfügbarkeit von essentiellen Vorprodukten zu gewährleisten und um den Abbau der Produkte zu verhindern, was letztendlich zur Erhöhung der finalen Produktkonzentration führt. Eine maximale Konzentration von 11,23 mM von oAB und eine maximale Konzentration von 4,6 mM Styrol, und somit eine zweite Phase von Styrol, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erreicht, wodurch die Bedeutung von Pseudomonaden als Produktionsstämme in der biobasierten industriellen Chemie hervorgehoben wird.