



Doctoral Thesis

The productivity of biocatalytic oxyfunctionalization reactions in polar solvent / aqueous media

Author(s):

Ionidis, Georgios

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005365199> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Doctoral Thesis ETH No. 16853

**The productivity of biocatalytic oxyfunctionalization
reactions in polar solvent / aqueous media**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

GEORGIOS IONIDIS

M.Sc. Food Biotechnology, University of Reading

born 18 July 1975

Citizen of Greece

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bernard Witholt, (Prof. em.), examiner

Prof. Dr. Andreas Schmid, co-examiner

Prof. Dr. Uwe Sauer, co-examiner

Zurich, 2006

Summary

Using living bacteria expressing oxygenase genes for the selective oxyfunctionalization of aromatic compounds with $\log P_{ow} < 4$ has economical and practical advantages for the chemical industry, but compounds with such $\log P_{ow}$ are generally toxic to bacteria and quickly inactivate the whole cell biocatalysts, even at low concentrations. However, several solvent-tolerant bacteria are able to grow in the presence of solvents with $\log P_{ow}$ as low as 2.5. This thesis investigated if using recombinant, solvent-tolerant *P. putida* DOT T1 as whole cell biocatalyst can alleviate the problem of host toxicity of aromatic compounds with $\log P_{ow}$: a) below the tolerance cutoff of 2.5 and b) 2.5 – 3. To evaluate reaction systems with $\log P_{ow} < 2.5$, *P. putida* DOT T1 was compared to the solvent-sensitive *E. coli* JM101 as a host for the three step oxidation of 2-methylquinoxaline ($\log P_{ow}$ 1.8) to 2-quinoxalinecarboxylic acid ($\log P_{ow}$ 1.8). *E. coli* JM101 accumulated 75 mM 2-quinoxalinecarboxylic acid in 9-hours, with a maximum specific activity of 13 U g_{CDW}^{-1} . For 2-methylquinoxaline oxidation, *P. putida* DOT T1 exhibited a similar maximum specific activity as compared to *E. coli* JM101, but accumulated 35% less product. This suggested that solvent-tolerance was not beneficial during bioconversions of compounds with $\log P_{ow}$ below the tolerance cutoff of 2.5. Studies in biphasic systems containing solvents with $\log P_{ow}$ 2.5 – 3, which are lethal to *E. coli* JM101, showed that solvent adaptation, lasting at least 3 hours was necessary for growth of *P. putida* DOT T1 in media with toluene ($\log P_{ow}$ 2.5) and that the recombinant *P. putida* DOT T1 exhibited stable enzymatic activity only around solvents with $\log P_{ow} > 2.9$. TtgGHI, one of the three solvent efflux pumps of *P. putida* DOT T1E, was alone sufficient for growth with toluene and the induction of the *ttgGHI* operon with 1-naphthol, enabled growth without toluene adaptation. In bioreactor containing octanol ($\log P_{ow}$ 2.9), *P. putida* DOT T1 overexpressing styrene monooxygenase epoxidized styrene ($\log P_{ow}$ 3.0) with a maximum activity of 1.4 U g_{CDW}^{-1} and accumulated 216 mM of styrene oxide in the octanol phase. In media with solvents, *P. putida* DOT T1E exhibited a 2/3 lower biomass yield, compared to solvent-free media. Using ^{13}C flux analysis, it could be shown that during growth on glucose around low $\log P_{ow}$ solvents or while carrying out NADH-dependent bioconversions, solvent-tolerant bacteria increased the NADH regeneration rate up to 3.7-fold compared to stress free conditions by (i) increasing the rate of glucose uptake and (ii) re-directing carbon from biomass synthesis towards energy generation.

This work showed that solvent-tolerant bacteria are able to maintain growth and enzymatic activity under cumulative stresses related to low $\log P_{ow}$ compounds, and their use as microbial hosts may alleviate the limitation of reagent toxicity in a variety of industrial bioprocesses.

Zusammenfassung

Die Verwendung von lebenden, Oxygenasen-exprimierenden Bakterien für die spezifische Oxyfunktionalisierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen mit $\log P_{ow} < 4$ hat Potential in der chemischen Industrie. Substanzen mit solch niedrigen $\log P_{ow}$ sind jedoch in der Regel toxisch für Bakterien und können den Ganzzellbiokatalysator schon bei niedrigen Konzentrationen inaktivieren. Interessanterweise wurden lösungsmitteltolerante Bakterien isoliert, die eine zweite Phase organischer Lösungsmittel mit $\log P_{ow} > 2.5$ tolerieren. In dieser Arbeit wurde die Verwendung des lösungsmitteltoleranten Stammes *Pseudomonas putida* DOT-T1E als Ganzzellbiokatalysator für zwei Szenarien untersucht: a) für $\log P_{ow}$ Werte unter der für diesen Stamm beschriebenen Toleranzgrenze von 2.5 und b) für den $\log P_{ow}$ Bereich von 2.5 - 3.

Für die Bewertung von Reaktionssystemen mit $\log P_{ow} < 2.5$, wurde die dreistufige Oxidation von 2-Methylchinoxalin ($\log P_{ow}$ 1.8) zu 2-Chinoxalincarbonsäure ($\log P_{ow}$ 1.8) mittels *P. putida* DOT-T1E und dem lösungsmittellempfindlichen *E. coli* JM101 benutzt. *E. coli* JM101 produzierte 75 mM 2-Chinoxalincarbonsäure in 9 Stunden, mit einer maximalen spezifischen Aktivität von $13 \text{ U g}_{CDW}^{-1}$. *P. putida* DOT-T1E hatte für diese Reaktion eine vergleichbare Aktivität, jedoch eine 35% geringere finale Produktkonzentration verglichen mit *E. coli* JM101. Beruhend auf diesen Ergebnissen postulieren wir hier, dass lösungsmitteltolerante Bakterien keinen Vorteil für die Umsetzung von Substanzen mit einem $\log P_{ow}$ unter ihrer Toleranzgrenze von 2.5 haben.

Der Einsatz von Lösungsmitteln mit $\log P_{ow}$ zwischen 2.5 und 3 benötigte eine mindestens dreistündige Anpassungsphase der Bakterien in gleichen Lösungsmitteln. Nach dieser Zeit wuchsen die Zellen in Kulturen die eine zweite Phase Toluol ($\log P_{ow}$ 2.5) enthielten, jedoch konnte eine stabile Monooxygenaseaktivität nur in Lösungsmitteln mit $\log P_{ow} > 2.9$ erreicht werden. Interessanterweise war schon eine der drei Lösungsmittelleffluxpumpen von *P. putida* DOT-T1E, nämlich TtgGHI, hinreichend für Wachstum mit einer zweiten Phase Toluol. Die Induktion des *ttgGHI* Operons konnte auch unabhängig von Toluol, z.B. mit 1-Naphtol erreicht werden. Mit dieser Induktion konnte die Anpassungsphase auf Toluol vermieden werden.

Ein *P. putida* DOT-T1E Stamm, der die Styrolmonooxygenase Gene (*StyA*) überexprimierte, hat Styrol ($\log P_{ow}$ 3.0) mit einer maximalen Aktivität von $1.4 \text{ U g}_{CDW}^{-1}$ epoxidiert und produzierte 216 mM Styroloxid in der Oktanolphase ($\log P_{ow}$ 2.9). In Medien mit Lösungsmitteln hatte *P. putida* DOT-T1E eine um 2/3 reduzierte Biomasseausbeute, verglichen mit Kulturen unter Normalbedingungen ohne Lösungsmittel. Mit Hilfe von ^{13}C

Markierungsexperimenten wurde eine Zunahme der NADH-Regenerationsrate in Abhängigkeit des Verbrauchs der Redoxkofaktoren gefunden. Während der NADH-abhängigen Biokatalyse war die NADH-Regenerationsrate bis zum 3.7-fachen erhöht. Interessanterweise kam diese Erhöhung durch zwei Mechanismen zustande: (i) durch eine vermehrte Aufnahme von Glukose und (ii) durch einen verringerten Bedarf für die Biomassesynthese und der parallelen Erhöhung der TCA-Zyklus Aktivität.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass lösungsmitteltolerante Bakterien in der Lage sind gleichzeitig zu wachsen und Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln mit $\log P_{ow} < 4$ durchzuführen. Somit haben diese Stämme das Potential Limitationen durch Substrat-/Produkttoxizitäten in industriellen Prozessen auszugleichen.