

Michael Hillen

Stabilization of physiology and C-H hydroxylation rates of whole-cell biocatalysts by reaction engineering

Volume 30

**SHAKER
VERLAG**

Stabilization of physiology and C-H hydroxylation rates of whole-cell biocatalysts by reaction 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. Michael Hillen

aus

Koblenz

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schmid
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Nett

Dortmund 2018

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

Michael Hillen

**Stabilization of physiology and
C-H hydroxylation rates of whole-cell biocatalysts
by reaction engineering**

Volume 30

D 290 (Diss. Technische Universität Dortmund)

Shaker Verlag
Aachen 2019

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., 2018

Copyright Shaker Verlag 2019

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 978-3-8440-6575-6

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

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Andreas Schmid bedanken, der es mir ermöglichte meine Dissertation am Lehrstuhl für Biotechnologie an der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der TU Dortmund anzufertigen. Vielen Dank Andreas für deine Unterstützung sowohl auf wissenschaftlicher als auch persönlicher Ebene und das hervorragende Arbeitsumfeld.

Ich danke Prof. Markus Nett für die Bereitschaft meine Dissertation als Zweitgutachter zu bewerten. Bei Prof. Gerhard Schembecker und Prof. Rolf Wichmann möchte ich mich für die Abnahme meiner Promotionsprüfung bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Gruppenleiter Prof. Bruno Bühler, der mir von Beginn bis zum Ende meiner Dissertation mit seiner wissenschaftlichen Expertise und seinem Engagement mit Rat und Tat zur Seite stand. Insbesondere die zahlreichen fachlichen Diskussionen sowie die Korrekturen und Anmerkungen bei der schriftlichen Ausarbeitung haben immens zum erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit beigetragen. Vielen Dank Bruno für die großartige Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Der von mir betreuten Studentin Marina Piepenbrinck danke ich für die wissenschaftlichen Erkenntnisse, die sie im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erbracht hat und die zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus Dortmund und aus Leipzig für die immer kollegiale und lockere Arbeitsatmosphäre bedanken. Danke dafür an: Anja, Anna, Bart, Babu, Birgitta, Bruno, Christian D., Christian N., Christian W., Christine, Dani, Düse, Eleni, Frank, Francesco, Freddy, Jana, Jan, Jianan, Jochen, Jon, Kamila, Karo, Karsten, Katja, Katrin, Kerstin, Kirsten, Lars, Linde, Magda, Mani, Marcel, Martin, Marvin, Mattijs Nadine, Oli, Özde, Patty, Rohan, Sabine, Stefanie, Sjef, Verena. Die schönen gemeinsamen Jahre mit den zahlreichen Kaffeeraumpartys, Betriebsausflügen, Weihnachtsfeiern, Davos-Trips und das regelmäßige Kicken in der Soccerworld werden mir immer in bester Erinnerung bleiben.

Mein größter Dank gilt meiner ganzen Familie, die mich sowohl im Studium als auch während meiner Promotion jederzeit uneingeschränkt unterstützt hat. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Frau Jennifer die mich durch alle Höhen und Tiefen meiner Promotion begleitet hat und mir auch in schwierigen Phasen großen Rückhalt gegeben hat. Ohne solch eine Unterstützung wäre meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank dafür.

Table of Contents

Danksagung.....	I
Table of contents.....	II
Summary.....	V
Zusammenfassung.....	VII
List of abbreviation.....	IX
1 Introduction.....	1
1.1 Preface.....	2
1.2 High potential of biocatalysis in the chemical industry	2
1.3 Maximizing bioprocess efficiency via different engineering approaches.....	4
1.4 Oxygenases - catalyzing the specific introduction of molecular oxygen.....	12
1.5 Oxyfunctionalisation of fatty acid methyl ester catalyzed by the alkane monooxygenase system AlkBGT.....	13
1.6 Scope of this thesis.....	16
2 Influence of different <i>alkBGT</i> and <i>alkL</i> expression levels on cell physiology and biocatalytic activity of recombinant <i>E. coli</i> W3110 and JM101	17
2.1 Abstract	18
2.2 Introduction	19
2.3 Materials and Methods.....	21
2.4 Results.....	24
2.5 Discussion	42
3 Intracellular fluxes of <i>E. coli</i> W3110 and JM101 expressing the <i>alkBGT</i> and <i>alkL</i> genes.....	47
3.1 Abstract	48
3.2 Introduction	49
3.3 Materials and Methods.....	51
3.4 Results.....	54
3.5 Discussion	62

4	Physiology analysis of heterologous oxygenase and porin containing <i>E. coli</i> during two-liquid phase biotransformation	65
4.1	Abstract	66
4.2	Introduction.....	67
4.3	Materials and methods	69
4.4	Results.....	72
4.5	Discussion	90
4.6	Conclusion	94
5	<i>E. coli</i> JM101 containing fine-tuned oxygenase and porin levels optimize metabolic network operation to support high and stable oxygenation rates	95
5.1	Abstract	96
5.2	Introduction.....	97
5.3	Materials and methods	99
5.4	Results.....	103
5.5	Discussion	108
6	General discussion	111
6.1	General Remarks.....	112
6.2	Improving the biocatalytic production of functionalized DAME via reaction engineering approaches.....	113
6.3	Carbon metabolism of recombinant <i>E. coli</i> during DAME hydroxylation.....	120
7	Conclusion and Outlook.....	121
7.1	Conclusion	122
7.2	Outlook.....	124
8	References.....	125
9	Appendix	143
	<i>Curriculum vitae</i>	145