Chassis Engineering

Pseudomonas taiwanensis VLB120 als Plattform für die Biotechnologie

BENEDIKT WYNANDS[2], NICK WIERCKX[2], HERMANN J. HEIPIEPER[1], CHRISTIAN EBERLEIN[1]

[1] DEPARTMENT FÜR UMWELTBIOTECHNOLOGIE, HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR UMWELTFORSCHUNG – UFZ

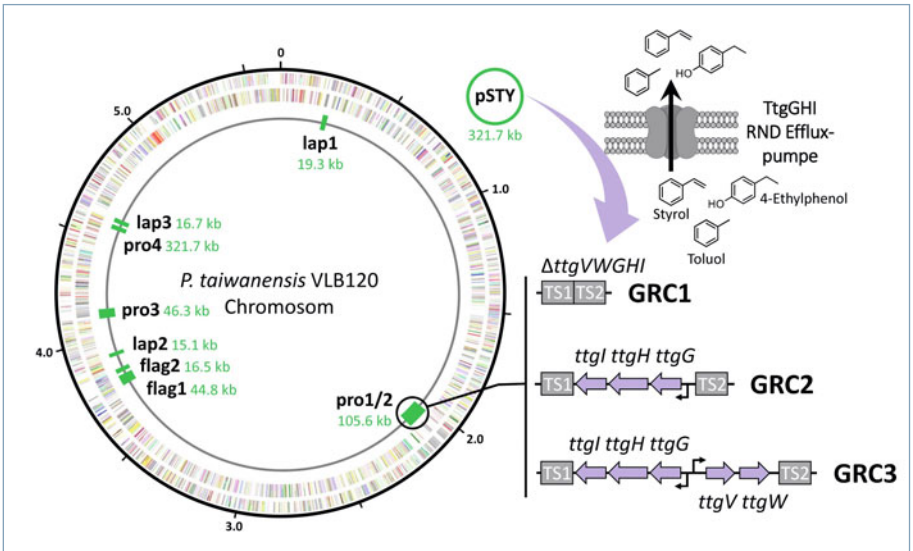
[2] INSTITUT FÜR BIO- UND GEOWISSENSCHAFTEN, IBG-1: BIOTECHNOLOGIE, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH

The microbial production of fine chemicals that can be used as pharmaceuticals or chemical building blocks is an important cornerstone of the sustainable bio-based economy. However, the efficient production of many chemicals is often hampered by limited tolerance of the bacterial hosts towards the substrates, products, or process conditions. Robust platform organisms are needed for economically viable biotechnological applications as an alternative to classical chemical synthesis.

DOI: 10.1007/s12268-023-0015-7
© Die Autoren 2023

Die mikrobielle Produktion werthaltiger Feinchemikalien aus nachhaltigen Rohstoffen oder industriellen Reststoffströmen ist eine wichtige Schlüsseltechnologie, die zum strukturellen Wandel der erdölbasierten Industrie hin zu einer grünen Bioökonomie beiträgt [1].

Ein wichtiger Aspekt dabei ist die Auswahl des Wirtsorganismus und dessen Stammentwicklung zur Optimierung der Produktion.



▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Genomreduktion im Rahmen des Chassis Engineering von *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 zur Generierung der GRC-Stämme. Das Megaplasmid (pSTY), Biofilm- (lap1, lap2, lap2) und Flagellen-assoziierte DNA-Segmente (flag1, flag2) sowie die Prophagen (pro1/2, pro3, pro4) wurden deletiert (GRC1). Durch die chromosomale Re-Integration der pSTY-codierten Effluxpumpen-Gene (*ttgGHI*) ohne und mit den regulatorischen Genen *ttgVW* wurden die Stämme GRC2 und GRC3 generiert. Modifizierte Abbildung aus Wynands *et al.* [6].

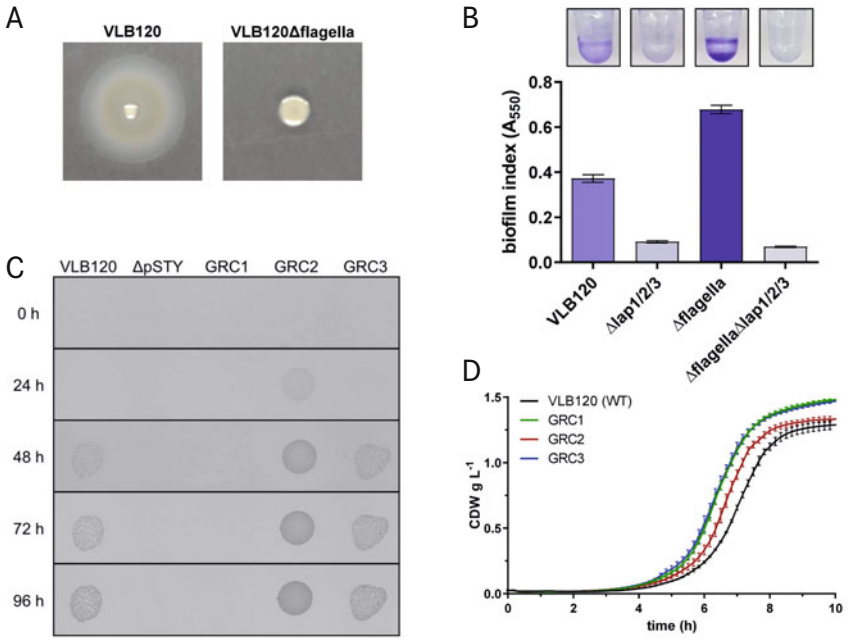
Neben dem Metabolic Engineering zur Umverteilung von Stoffflüssen, ggf. der Etablierung synthetischer Biosynthesewege und der daraus resultierenden Überproduktion des Zielprodukts, kommt auch dem Chassis Engineering eine immer größere Bedeutung bei. Dabei werden grundlegende Zellfunktionen und Eigenschaften des Wirts mit Hinblick auf die Bedingungen des geplanten Prozesses modifiziert, um eine verbesserte Stammplattform zu schaffen. Mikroorganismen besitzen viele physiologische Funktionen und Eigenschaften, die zwar in ihrer natürlichen ökologischen Nische vorteilhaft, jedoch bei der Nutzung in biotechnologischen Systemen entweder verzichtbar oder sogar unerwünscht sein können. Dies ist wenig überraschend, da sich die Bedingungen in der Natur von denen im Labor häufig grundlegend unterscheiden. Jedoch können bestimmte natürliche Eigenschaften, z. B. Toleranzmechanismen, für spezifische biotechnologische Prozesse nützlich sein. Das Engineering des Chassis oder dessen Auswahl aus einer Reihe bereits verfügbarer modifizierter Stämme sollte daher unter sorgfältiger Berücksichtigung der geplanten Anwendungsbedingungen erfolgen [2].

Pseudomonaden werden aufgrund ihrer Stress- und Lösungsmitteltoleranz immer häufiger für biotechnologische Prozesse eingesetzt [3, 4]. Viele Stämme mit der höchsten Toleranz gehören jedoch zur Spezies *Pseudomonas putida*, die in Deutschland der Risikogruppe 2 zugeordnet ist, was sie für die biotechnologische Industrie aufgrund der damit verbundenen kostspieligen Sicherheitsmaßnahmen weniger interessant macht. Einzige Ausnahme ist *P. putida* KT2440, der zwar als S1-Organismus klassifiziert ist, aber leider keine hohe Lösungsmitteltoleranz aufweist. Diese Klassifizierung von *P. putida* sollte für einige Stämme dringend überdacht werden. Zusätzlich ist die Erforschung von neuen, interessanten bakteriellen Stämmen für biotechnologische Anwendungen in vollem Gange. Diesbezüglich ist *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 ein geeigneter Kandidat, der S1-klassifiziert ist und eine ausgeprägte Toleranz gegenüber hydrophoben organi-

schen Lösungsmitteln besitzt [5]. Im Rahmen eines Chassis-Engineering-Ansatzes wurde dieses Bakterium von uns insbesondere durch die Deletion großer DNA-Segmente und deren codierten Funktionen optimiert. Dabei wurde das Genom insgesamt um ca. zehn Prozent reduziert (**Abb. 1**, [6]).

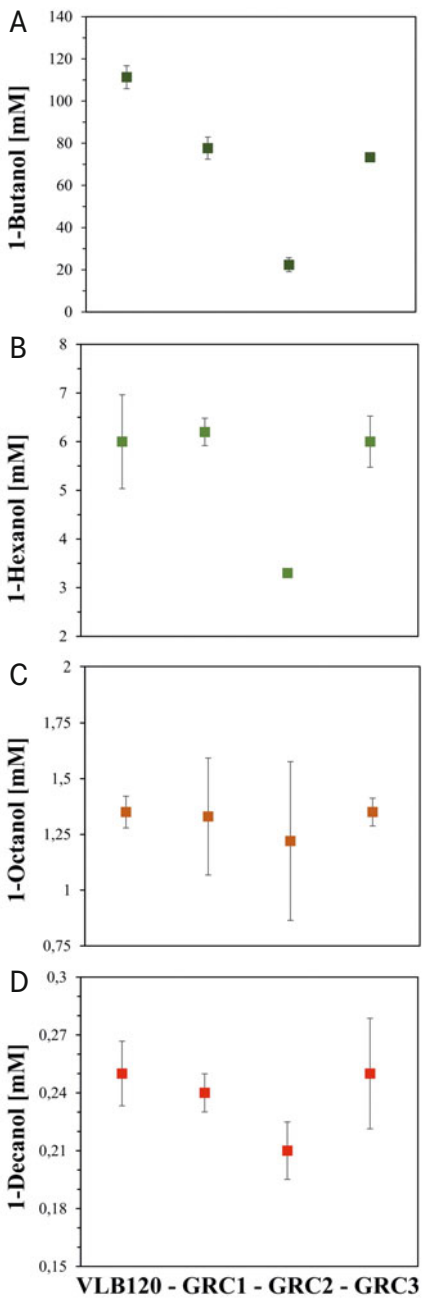
In den meisten biotechnologischen Prozessen wird das Kultivierungsmedium durch Rühren durchmischt, sodass anders als in vielen ökologischen Systemen keine ausgeprägten Gradienten entstehen und der Ganzzellbiokatalysator gleichmäßig verteilt wird. Die aktive Fortbewegung durch Schwimmen und die Ausbildung dafür benötigter Flagellen stellt daher für die meisten Prozesse keinen Vorteil, sondern eine biosynthetische und energetische Bürde dar [7]. Um die Ressourcen für die Biosynthese und den Betrieb der Flagellen zu sparen, wurden die Flagellen-codierenden Segmente (flag1, flag2) – und somit die Fähigkeit zu schwimmen – deletiert (**Abb. 2A**). Damit ging jedoch auch eine erhöhte Biofilmbildung einher (**Abb. 2B**), was für die meisten industriellen Prozesse unerwünscht ist. Um dem entgegenzuwirken, wurden drei Cluster mit strukturellen und regulatorischen Biofilmgenen deletiert (lap1, lap2, lap3), was die Biofilmbildung stark reduzierte (**Abb. 2B**).

In der Natur sind genetische Vielfalt und die Mechanismen, die zu jener führen, ein Vorteil, da sich dort Selektionsdrücke schnell ändern können. In der Biotechnologie wird jedoch ein genetisch stabiler und robuster Wirt benötigt, um reproduzierbare und ggf. kontinuierliche Prozesse im großen Maßstab zu etablieren. Unter diesem Gesichtspunkt sollten genetische Elemente eliminiert werden, die zu Rekombination führen. Das Megaplasmid pSTY und große provirale DNA-Segmente (pro1/2, pro3, pro4) wurden in diesem Zusammenhang identifiziert und deletiert. Neben fast ausschließlich verzichtbaren Elementen codiert das Megaplasmid pSTY jedoch die Effluxpumpe TtgGHI, eine Schlüsselkomponente bei der Toleranz gegenüber hydrophoben Aromaten. Während diverser genetischen Modifikationen von *P. taiwanensis* VLB120 kam es zum spontanen Verlust von pSTY und somit zu einer genetischen Instabilität und dem Toleranzverlust gegenüber hydrophoben Aromaten, wie Styrol und Toluol, die Substrate dieser Pumpe sind. Daher wurden die Gene der Effluxpumpe (*ttgGHI*) nach der gezielten Deletion des Megaplasmids (ΔpSTY) ohne und mit den regulatorischen Genen (*ttgVW*) an die



▲ **Abb. 2:** Eigenschaften der genomreduzierten Stämme des *Pseudomonas taiwanensis*-VLB120-Wildtyps. **A**, Schwimmverhalten des *Pseudomonas taiwanensis*-VLB120-Wildtyps und der Δflagella-Mutante (Δflag1, Δflag2) nach 24 h in Weichagar. **B**, Biofilmbildung des Wildtyps und der Mutanten Δflagella, Δlap1/2/3 und ΔflagellaΔlap1/2/3 nach 10 h in Standkultur. **C**, Wachstum der verschiedenen Stämme auf LB-Platte mit einer zweiten Phase Toluol nach Adaption mit Styrol. **D**, Wachstum in Minimalmedium mit Glucose. Modifizierte Abbildung aus Wynands *et al.* [6].

ursprünglich Position des überlappenden Prophagen 1/2 transplantiert, um neben dem Lösungsmittel-sensitiven Stamm GRC1 auch einen konstitutiven (GRC2 mit pro1/2::*ttgGHI*) und induzierbaren (GRC3 mit pro1/2::ttg*VWGHI*) Lösungsmittel-toleranten Stamm zu generieren (**Abb. 2C**). Alle finalen Stämme wiesen, verglichen mit dem bereits schnell und effizient wachsenden Wildtyp, eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit (**Abb. 2D**) und höhere Biomasseausbeuten auf. Neben diesen verbesserten Merkmalen und der ermöglichten Auswahl aus einer Reihe von Stämmen mit unterschiedlicher Lösungsmitteltoleranz gegenüber hydrophoben Aromaten, ist es ebenfalls wichtig, dass die Toleranz des Wildtyps gegenüber aliphatischen Lösungsmitteln auch in den genomreduzierten Stämmen erhalten bleibt und diese Fähigkeit nicht mit der Reduzierung des Genoms, z. B. durch Veränderung der Zelloberfläche, beeinträchtigt wurde. Um dies zu überprüfen, wurden die GRC-Stämme sowie der VLB120-Wildtyp in einer Vergleichsstudie mit verschiedenen Konzentrationen von *n*-Alkanolen konfrontiert [8]. Bei der Auswahl der n-Alkanole wurde auf eine breite Fächerung zwischen hydrophoben (1-Butanol, 1-Hexanol) und stark hydrophoben Lösungsmitteln (1-Octanol, 1-Decanol) sowie eine gute Vergleichbarkeit mit Literaturdaten geachtet. Als Maß für die Lösungsmitteltoleranz der Bakterien wurde die mittlere effektive Konzentration (EC50) der *n*-Alkanole in Toxizitätsversuchen bestimmt. Die EC50 gibt dabei an welche Konzentration zu einer 50%igen Verringerung der bakteriellen Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle führt. Hierbei zeigte sich, dass die Lösungsmitteltoleranzen von GRC1 und GRC3 für 1-Hexanol, 1-Octanol und 1-Decanol vergleichbar mit denen des Wildtyps sind (**Abb. 3**). Nur bei 1-Butanol zeigte der Wildtyp eine bessere Robustheit als alle GRC-Stämme. Dies kann mit der verminderten Hydrophobizität der Zelloberfläche der GRC-Stämme zusammenhängen, welche durch das Fehlen von Flagellen und Adhäsionsproteinen zustande kommt und bei einer Inkubation mit 1-Butanol besonders ins Gewicht fällt. Ein weiterer Grund könnten 1-Butanol-abbauenden Enzyme sein, die auf dem Megaplasmid pSTY codiert sind. Die niedrigeren EC50-Werte für GRC2 sind wahrscheinlich durch die konstitutive Expression der TtgGHI-Effluxpumpe und den damit verbundenen hohen Energieaufwand erklärbar.



▲ **Abb. 3:** EC50-Werte für *P. taiwanensis* VLB120, GRC1, GRC2, GRC3 für **A**, 1-Butanol (dunkelgrüne Quadrate), **B**, 1-Hexanol (grüne Quadrate), **C**, 1-Octanol (orangefarbene Quadrate) und **D**, 1-Decanol (rote Quadrate). Modifizierte Abbildung aus Cárdenas *et al.* [8].

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass der Prozess der Genomreduktion Lösungsmitteltoleranz gegenüber *n*-Alkanolen nicht beeinträchtigt. Dies gilt auch für die Toleranz gegenüber aromatischen Lösungsmitteln wie Toluol und Styrol und anderen hydrophoben Aromaten [6] für die Stämme GRC2 und GRC3, in denen die TtgGHI-Effluxpumpe vorhanden ist (**Abb. 2C**). Die konstitutive Expression der Effluxpumpe TtgGHI führte jedoch in Abwesenheit von Lösungsmitteln zu einem verlangsamten Wachstum (**Abb. 2D**) und einer reduzierten Biomasseausbeute verglichen mit GRC1 und GRC3. Dies verdeutlicht, dass es keinen Allzweck-Chassis-Stamm gibt, sondern dieser stets maßgeschneidert für den Prozess entwickelt oder ausgewählt werden muss. In Anwendungsbeispielen haben sich die GRC-Stämme als äußerst nützlich für die *de novo*-Bioproduktion von u. a. Phenol, 4-Coumarat und Stilbenen erwiesen [6, 9, 10]. Insbesondere *P. taiwanensis* GRC3 ist ein stabiler Chassis-Organismus mit schnellen Wachstumsraten und hohen Erträgen sowie einem stresstoleranten Phänotyp, der für zukünftige industrielle Anwendungen von großem Interesse sein dürfte.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) über das Projekt NO-STRESS (Förderkennzeichen 031B0852A und 031B085C) gefördert.

Literatur

[1] Intasian P, Prakinee K, Phintha A et al. (2021) Enzymes, in vivo biocatalysis, and metabolic engineering for enabling a circular economy and sustainability. Chem Rev 121: 10367–10451
[2] Volmer J, Schmid A, Bühler B (2015) Guiding bioprocess design by microbial ecology. Curr Opin Microbiol 25: 25–32
[3] Bitzenhofer NL, Kruse L, Thies S et al. (2021) Towards robust Pseudomonas cell factories to harbour novel biosynthetic pathways. Essays Biochem 65: 319–336
[4] Schwanemann T, Otto M, Wierckx N, Wynands B (2020) Pseudomonas as versatile aromatics cell factory. Biotechnol J 15: e1900569
[5] Park JB, Bühler B, Panke S et al. (2007) Carbon metabolism and product inhibition determine the epoxidation efficiency of solvent-tolerant Pseudomonas sp. strain VLB120DeltaC. Biotechnol Bioeng 98: 1219–1229
[6] Wynands B, Otto M, Runge N et al. (2019) Streamlined Pseudomonas taiwanensis VLB120 chassis strains with improved bioprocess features. ACS Synth Biol 8: 2036–2050
[7] Martínez-García E, Nikel PI, Chavarría M, de Lorenzo V (2014) The metabolic cost of flagellar motion in Pseudomonas putida KT2440. Environ Microbiol 16: 291–303
[8] Cárdenas Espinosa MJ, Schmidgall T, Pohl J et al. (2023) Assessment of new and genome-reduced Pseudomonas strains regarding their robustness as chassis in biotechnological applications. Microorganisms 11: 837
[9] Wynands B, Kofler F, Sieberichs A et al. (2023) Engineering a Pseudomonas taiwanensis 4-coumarate platform for production of para-hydroxy aromatics with high yield and specificity. Metab Eng 78: 115–127
[10] Schwanemann T, Otto M, Wynands B et al. (2023) A Pseudomonas taiwanensis malonyl-CoA platform strain for polyketide synthesis. Metab Eng 77: 219–230

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de.

Benedikt Wynands und Nick Wierckx

Hermann J. Heipieper und Christian Eberlein

Korrespondenzadressen:
Prof. Dr. Nick Wierckx
Dr. Benedikt Wynands
Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich
D-52428 Jülich
n.wierckx@fz-juelich.de
b.wynands@fz-juelich.de

Dr. Hermann J. Heipieper
Dr. Christian Eberlein
Department für Umweltbiotechnologie
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
hermann.heipieper@ufz.de
christian.eberlein@ufz.de