



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards microbial platforms for lignin valorization: Pseudomonas putida cell factories and Bacillus synthetic communities

Zhou, Q.

Citation

Zhou, Q. (2026, June 12). *Towards microbial platforms for lignin valorization: Pseudomonas putida cell factories and Bacillus synthetic communities.*

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4304895>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4304895>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Lignine is de grootste hernieuwbare bron van aromatische koolstof in plantaardige biomassa; toch blijft het gebruik ervan een belangrijk knelpunt voor bioraffinaderijen, omdat de heterogene en complexe structuur, in combinatie met de oxidatieve tolerantie, gecontroleerde depolymerisatie bemoeilijkt. In de praktijk wordt een groot deel van de lignine die vrijkomt bij de verwerking van lignocellulose onderbenut en vaak ingezet voor laagwaardige toepassingen. Dit proefschrift behandelt deze centrale uitdaging binnen de duurzame biotechnologie: de afbraak en valorisatie van lignine door middel van bacteriën.

Hoofdstuk 2 beschrijft de huidige kennis over microbiële afbraak van lignine en de bijbehorende geproduceerde bacteriële of schimmelenzymen. Dit overzichtsartikel benadrukt dat schimmelsystemen krachtige depolymerisatoren zijn, maar dat bacteriële platforms voordelen bieden voor industriële toepassing dankzij hun snellere groei, eenvoudigere kweekbaarheid, grotere specificiteit en superieure genetische manipuleerbaarheid. Met name *Pseudomonas putida* profileert zich als een aantrekkelijk gastheerorganisme, vanwege het brede aromatische katabolisme, de tolerantie tegenover toxische verbindingen en de beschikbaarheid van geavanceerde genetische hulpmiddelen voor het optimaliseren van metabole routes. Het hoofdstuk schetst hoe deze eigenschappen *P. putida* positioneren als een potentiële "celfabriek" die de oxidatieve afbraak van lignine kan integreren en de vrijgekomen aromaten kan omzetten in specifieke tussenproducten en eindproducten.

In **hoofdstuk 3** worden de uitgescheiden (oxidatieve) enzymen experimenteel beschreven die van belang zijn voor de groei van *P. putida* KT2440 op lignine, en de omzetting van lignine-afgeleide aromaten. Kandidaat-enzymen werden aanvankelijk geprioriteerd door ze te vergelijken met een *P. putida*-isolaat waarvan eerder was aangetoond dat het op lignine kan groeien; hierbij lag de focus in eerste instantie op enzymen waarvan werd voorspeld dat ze zouden worden uitgescheiden. Deze analyse wees onverwachts PP_1686, geannoteerd als glutathionperoxidase (GPx) en homoloog aan zgn. "Versatile Peroxidases" (veelzijdige peroxidasen, VP), aan als van cruciaal belang, samen met een homoloog van het DyP-type peroxidase (PP_3248). Er werden gerichte deleties geconstrueerd en de groei werd gemeten op representatieve, van lignine afgeleide aromaten (p-coumarinezuur, ferulazuur en syringazuur), en op de

op lignine gelijkende kleurstof methyleenblauw. De deletie van PP_1686 leidde tot een duidelijk groei-afname op aromatische substraten en verminderde ontkleuring van de kleurstof, terwijl de deletie van PP_3248 onder de geteste omstandigheden geen uitgesproken fenotype opleverde. Transcriptomics toonde verder aan dat het verlies van PP_1686 een gecoördineerde metabole herprogrammering teweegbracht, consistent met een verstoorde koppeling van het redox-metabolisme: onderdrukking van de belangrijkste aromatische 'funneling' (waarbij pobA-monooxygenase betrokken is) naast een bredere onderdrukking van translatie- en DNA-reparatiemodules. Samen laten deze resultaten zien dat PP_1686 een bredere functie heeft dan alleen als generiek ontgiftingsenzym: het ondersteunt het gebruik van lignine-afgeleide aromaten door de oxidatieve balans af te stemmen op de koolstofstroom, waarmee wordt benadrukt dat redoxregulatie een zeer belangrijk onderdeel vormt bij het ontwerpen van robuuste ligninebioconversie in *P. putida*.

Hoofdstuk 4 verschuift de focus van engineering van één bacteriestam naar een gemeenschapsperspectief. Het ontwikkelt een rationele workflow voor het construeren van een lignine-afbrekende synthetische bacteriële gemeenschap (LDSynCom) uit een diverse *Bacillales*-collectie, door bottom-up en top-down selectie te integreren. Het ontwerpprincipes is gebaseerd op de veronderstelling dat biofilm-geassocieerde leefstijlen de depolymerisatie van lignine kunnen bevorderen door cellen, extracellulaire matrices en enzymactiviteiten te concentreren aan het lignine-grensvlak, terwijl verschillende functionele rollen over de individuele cellen kunnen worden verdeeld. De resulterende 11-koppige LDSynCom vormde biofilmstructuren op ligninedeeltjes, zoals zichtbaar gemaakt met behulp van scanningelektronenmicroscopie na groei op een ligninehoudend medium. Functionele ligninemodificatie werd bevestigd door schudflesexperimenten. Belangrijk is dat het LDSynCom de ophoping van fenolische producten verhoogde ten opzichte van abiotische controles. Hoofdstuk 4 biedt een ecologisch onderbouwd en hanteerbaar SynCom-raamwerk voor de depolymerisatie van lignine, met een duidelijke route naar mechanistische "drop-out/add-in"-experimenten om de variatie en verdeling van verschillende rollen en functies onder de leden van de SynCom in kaart te brengen.

Hoofdstuk 5 keert terug naar het "celfabriek"-concept door te testen of lignine-actieve oxidatieve enzymen functioneel kunnen worden geproduceerd in *P. putida* KT2440. Dit hoofdstuk richt zich op DyP-type peroxidases (Dyp) van *Thermobifida fusca*,

Rhodococcus jostii RHA1 en *Pseudomonas fluorescens*, inclusief constructen die zijn gemodificeerd met signaalpeptiden om secretie of lokalisatie in het periplasma te bevorderen. Twee in het genoom geïntegreerde expressieplatforms werden geëvalueerd: een constitutief mini-Tn7-gebaseerd systeem (pBG) voor stabiele insertie van één kopie, en een induceerbaar, orthogonaal polymerase-gestuurd systeem (pPUT) ontworpen voor strikte controle en hoge productie. Onze resultaten wijzen erop dat de DyP uit *T. fusca* tot expressie werd gebracht met duidelijke peroxidase-activiteit, waarmee *P. putida* wordt gevalideerd als een geschikte gastheer voor actieve DyP-enzymen onder de geteste omstandigheden.

Hoofdstuk 6 bespreekt kritisch de knelpunten en uitdagingen die zijn ondervonden in het huidige proces van microbiële afbraak en valorisatie. Het in dit proefschrift beschreven werk toont aan dat de bioconversie van lignine in *P. putida* niet alleen beperkt wordt door "enzymbeschikbaarheid", maar ook door redox- en stressmanagement. Tegelijkertijd suggereren de SynCom-resultaten dat ecologische kenmerken zoals biofilmvorming kunnen worden beschouwd als manipuleerbare "proceskenmerken" die de ligninedepolymerisatie aan grensvlakken verbeteren. Samen bieden deze inzichten een routekaart voor het bouwen van robuustere en voorspelbaardere lignineafbraaktechnologieën, hetzij als gemanipuleerde platforms met één organisme, hetzij als functioneel gecompartmenteerde microbiële gemeenschappen, die in staat zijn om van lignine afgeleide koolstof om te zetten in producten en processen met een hogere waarde.