

Björn-Johannes Harder

**Modellbasiertes Metabolic
Engineering zur Optimierung
der Itaconatproduktion in
*Escherichia coli***



Modellbasiertes Metabolic Engineering zur Optimierung der Itaconatproduktion in *Escherichia coli*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur

(Dr.-Ing.)

von M.Sc. Björn-Johannes Harder
geb. am 22.11.1987 in Frankfurt am Main

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission: Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl
Dr.-Ing. Steffen Klamt
Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Marwan
Prof. Dr.-techn. Elmar Heinzle

eingereicht am: 24.05.2018

Promotionskolloquium am: 7.11.2018

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 52

Björn-Johannes Harder

**Modellbasiertes Metabolic Engineering zur
Optimierung der Itaconatproduktion in *Escherichia coli***

Shaker Verlag
Aachen 2018

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2018

Copyright Shaker Verlag 2018

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6360-8

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Steffen Klamt für die vielen hilfreichen Diskussionen und die Hilfe bei der Einarbeitung in die modellgestützte Analyse des Stoffwechsels von *E. coli*. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen trugen maßgebend mit zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Katja Bettenbrock, die jederzeit für Fragen zum experimentellen Teil dieser Arbeit zur Verfügung stand.

Mein Dank gilt auch Prof. Marwan (Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg) und Prof. Heinzle (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) für die Begutachtung meiner Arbeit.

Weiterhin sind meine Laborkollegen Andrea Schütze und Ruxandra Rehner lobend zu erwähnen, welche mir in Fragen der Analytik zur Seite standen.

Des Weiteren gebührt mein Dank meinen Bürokollegen Sabine Koch, Axel von Kamp und Annika Nitzschke, welche sowohl bei wissenschaftlichen Fragen ein offenes Ohr hatten, als auch durch Gespräche über nicht wissenschaftliche Fragen den Büroalltag bereicherten.

Großer Dank gilt auch der ganzen Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die stete Unterstützung danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Zusammenfassung

Aufgrund der begrenzten fossilen Ressourcen, ist ein Wandel von der aktuellen petrochemischen Industrie zu einer nachhaltigen bio-basierten chemischen Industrie eine der wesentlichen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts. Petrochemisch produzierte Grundchemikalien können prinzipiell durch so genannte (bio-basierte) Plattformchemikalien ersetzt werden. Die Herausforderung besteht darin, die biotechnologischen Prozesse so zu optimieren, dass die Chemikalien kostengünstig produziert werden können.

In dieser Arbeit sollte die Produktion der potentiellen Plattformchemikalie Itaconat optimiert werden. Hierfür wurde zunächst der Weg für die Itaconatbiosynthese in *Escherichia coli* eingebracht. Da der mikrobielle Stoffwechsel jedoch für die Produktion von Biomasse ausgerichtet ist, wurden nur geringe Mengen an Itaconat synthetisiert. Um die intrazellulären Flüsse gezielt zum Produkt umzuleiten, wurde daher ein iterativer modellbasierter Ansatz verfolgt, mit dem Kombinationen von Gendeletionen berechnet werden, die zur wachstumsgekoppelten Synthese von Itaconat führen. Dieser Ansatz erlaubte auch eine Anpassung des Modells, wenn eine signifikante Veränderung der Nebenproduktbildung beobachtet wurde. So wurden sowohl die Abgabe von Pyruvat (Iteration 2) als auch die Abgabe und Aufnahme von Glutamat (Iteration 3) im Verlauf der Stammkonstruktion ins Modell integriert. Über drei Iterationen wurde somit der Stamm ita23 (MG1655 Δ aceA Δ sucCD Δ pykA Δ pykF Δ pta Δ Picd::cam_P2 /pCadCs) konstruiert, welcher Itaconat mit der gewünschten hohen Ausbeute produzierte. Die im Schüttelkolben erzielte Ausbeute von 0,77 mol/(mol Glucose) ist zudem die höchste Ausbeute, die jemals für die heterologe Itaconatproduktion beschrieben wurde. Für eine strikte Wachstumskopplung, wie sie durch den modellbasierten Ansatz erzwungen werden soll, wären jedoch noch weitere Interventionen zu implementieren.

Neben einer hohen Produktausbeute wird für die industrielle Produktion eine hohe Produktivität gefordert. Beide können jedoch nicht gleichzeitig maximiert werden. Ein attraktiver Ansatz ist daher ein sogenannter zweistufiger Prozess, bei dem Biomasse- und Produktbildung entkoppelt werden. Somit kann in der ersten Stufe die Produktion der Biomasse und in der zweiten Stufe die Synthese des Produktes optimiert werden. In dieser Arbeit wurde basierend auf dem vorher konstruierten Itaconatüberproduzenten (ita23) solch ein zweistufiger Prozess entworfen. Hierfür wurde ein Stamm mit einem dynamisch regulierten TCA-Zyklus konstruiert. Die temperaturabhängige Expression der Isocitratdehydrogenase ermöglichte die schnelle Generierung von Biomasse bei hoher Temperatur (37 °C) und die Produktion von Itaconat bei niedriger Temperatur (\leq 30 °C). Unter Berücksichtigung der Umschaltzeit von der Wachstums- in die Produktionsphase wurde anschließend ein Bioreaktorprozess entworfen, der durch die zweiphasige Prozessführung eine um 22 % höhere volumetrische Produktivität aufwies als ein entsprechender einstufiger Prozess. Im Vergleich zum statischen Stamm ita23 konnte zudem der Titer um 46 % auf 46,9 g/l erhöht werden. Zudem war für das Wachstum des dynamischen Produktionsstammes keine Zugabe von externen Glutamat nötig.

Summary

Due to limited fossil resources, the change from the current petrochemical industry to a sustainable bio-based chemical industry is one of the main challenges of the 21st century. In principle, so-called (bio-based) platform chemicals can replace petrochemically produced bulk chemicals. The challenge is to optimize the biotechnological processes for the cost-efficient production of these compounds.

This work aimed to optimize the production of the potential platform chemical itaconate. Initially, the pathway for the itaconate biosynthesis was introduced into *Escherichia coli*. However, since the microbial metabolism is optimized for biomass formation, only small amounts of itaconate were synthesized. For the targeted redirection of the intracellular fluxes to the product, an iterative model-based approach allowing the calculation of combinations of gene deletions for growth-coupled synthesis of itaconate was pursued. This approach also enabled an adaptation of the model, if significant changes in byproduct formation were observed. By this way, the excretion of pyruvate (iteration 2) as well as the excretion and uptake of glutamate (iteration 3) were integrated into the model in the course of the strain construction. Within three iterations, the strain ita23 (MG1655 $\Delta aceA \Delta sucCD \Delta pykA \Delta pykF \Delta pta \Delta Picd::cam_P2$ /pCadCs) was constructed, which produced itaconate with the desired high yield. Moreover, the yield of 0,77 mol/(mol glucose) of the shake flask cultivation was the highest yield ever reported for the heterologous itaconate production. However, to achieve strict growth-coupling as demanded by the model-based approach, further interventions would have to be implemented.

Besides a high yield, a high productivity is required for the industrial production. Both cannot be optimized simultaneously. Therefore, an attractive approach is a so-called two-stage process, decoupling biomass and product formation. Hence, the production of biomass can be optimized in the first stage and the synthesis of the product in the second stage. In this work, a two-stage process was designed based on the high yield itaconate production strain ita23. For this purpose, a strain with a dynamically regulated TCA-cycle was constructed. The temperature-dependent expression of the isocitrate dehydrogenase enabled the fast generation of biomass at high temperature (37 °C) and the production of itaconate at low temperature (≤ 30 °C). Considering the time delay between growth and production phase, a bioreactor process was developed, which showed an increase in productivity by 22 % in the two-stage process compared to the one-stage process. In comparison to the static strain ita23, the titer was improved by 46 % to 46,9 g/l. Moreover, no addition of glutamate was necessary anymore for the growth of the dynamic production strain.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen von Reaktionen und Metaboliten finden sich im Anhang in den Tabellen A1 und A2.

Abkürzung	Bedeutung
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
AHL	2-Oxohexanoylhomoserinlacton
asRNA	antisense RNA
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CBM	constraint-based modeling
cDNA	komplementäre DANN
cMCS	constrained Minimal Cut Set
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAD	Diodenarraydetektor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOE	Department of Energy (Energieministerium USA)
dsDNA	doppelsträngige DANN
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFV	Elementarer Flussvektor
EM	Elementarmodus/ Elementarmoden
EMB	Bedingung für Elementarmodus
FBA	Flussbilanzanalyse
FVA	Flussvariabilitätsanalyse
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
KO	Knockout (Gendeletion)
LB	Luria-Bertani
MCS	Minimal Cut Set
Mio	Millionen
MMF	Minimale metabolische Funktionalität
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Mrd	Milliarden
NB	Nebenbedingung
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation
OD	optische Dichte
PAM	Protospacer angrenzendes Motiv
PCR	Polymerasekettenreaktion
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPW	Pentosephosphatweg
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonucleinsäure
SBR	Styrol-Butadien-Kautschuk
SFV	stationäre Flussverteilung
sgRNA	einzelne führende RNA
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
sRNAs	synthetische regulatorische RNAs
ssDNA	einzelsträngige DNA
TCA	Tricarbonsäure
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretische und biologische Grundlagen	7
2.1. Itaconat	7
2.1.1. Eigenschaften und Anwendungen.....	7
2.1.2. Biosynthesewege.....	8
2.1.3. Mikrobielle Produktion.....	10
2.2. Stammkonstruktion.....	15
2.2.1. Deletion von Genen aus dem Chromosom von <i>E. coli</i>	15
2.2.2. Methoden zur dynamischen Regulierung von Stoffwechselwegen	17
2.2.3. Adaptive Evolution	19
2.3. Modellbasiertes Metabolic Engineering.....	20
2.3.1. Stöchiometrische Netzwerkanalyse	20
2.3.2. Verwendung stöchiometrischer Netzwerke zur Identifizierung von Stammdesign-Strategien basierend auf Gendeletionen.....	25
3. Material und Methoden	31
3.1. Stämme und Stammkonstruktion.....	31
3.2. Plasmide.....	36
3.3. Molekularbiologische Methoden.....	39
3.3.1. Isolierung genomischer DNA	39
3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
3.3.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Bestimmung der DNA-Konzentration ..	40
3.3.4. Gelelektrophorese	40
3.3.5. Restriktionsverdau und Ligation.....	40
3.3.6. Elektroporation	41
3.3.7. Hitzeschock.....	41
3.4. Nährmedien	42
3.5. Kultivierung.....	44
3.5.1. Kultivierung im Schüttelkolben	44
3.5.2. Kultivierung im Bioreaktor.....	45
3.6. Probennahme und Bestimmung der Biotrockenmasse	46
3.7. Bestimmung der extrazellulären Metabolite.....	46

3.7.1. Enzymatische Bestimmung.....	46
3.7.2. Bestimmung über HPLC.....	46
3.8. Bestimmung der Enzymaktivität.....	47
3.9. Bestimmung der Expressionsstärke.....	49
3.9.1. RNA-Isolierung.....	49
3.9.2. Reverse Transkription.....	49
3.9.3. Real-Time PCR.....	49
3.10. Adaptive Evolution und Genomsequenzierung.....	50
3.11. Berechnung von Ausbeuten und Raten.....	51
3.12. Netzwerkmodell des Zentralstoffwechsels von <i>E. coli</i>	52
4. Ergebnisse und Diskussion.....	53
4.1. Analyse des Modells in Bezug auf Produktbildung und Wachstum.....	53
4.2. Einfluss der Itaconatkonzentration auf das Wachstum von MG1655.....	57
4.3. Implementierung des Itaconatsyntheseweges.....	58
4.4. Modellbasierte iterative Optimierung der Itaconatproduktion.....	60
4.4.1. Iteration 1 – TCA und Glyoxylatzyklus.....	64
4.4.2. Iteration 2 – Teilung des Flusses am PEP/Pyruvat-Knoten.....	64
4.4.3. Iteration 3 – Blockierung der Glutamatsynthese.....	65
4.4.4. Kultivierung von ita23 im Bioreaktor.....	68
4.4.5. Zusammenfassung.....	70
4.5. Untersuchung der Wachstumskopplung der Itaconat-produktion.....	71
4.5.1. Untersuchung der Kopplung in ita23.....	72
4.5.2. Untersuchung der Kopplung in ita23 Δ mdh.....	75
4.5.3. Zusammenfassung.....	78
4.6. Dynamische Regulierung der Itaconatproduktion.....	79
4.6.1. Theoretische Untersuchung des Einflusses der Prozessführung auf die volumetrische Produktivität.....	79
4.6.2. Implementierung eines molekularen Schalters zur temperatur-abhängigen Kontrolle des Wachstums.....	82
4.6.3. Dynamische Regulation der Itaconatproduktion.....	84
4.6.4. 2-Phasen Bioreaktorkultivierung.....	88
4.6.5. Zusammenfassung.....	91
5. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	93

Anhang	101
Literaturverzeichnis.....	119