

Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure

Andreas Otten

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Bio- and Geosciences (IBG)
Biotechnology (IBG-1)

Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure

Andreas Otten

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 64

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-860-0

Inhaltsverzeichnis

I	Summary	1
II	Zusammenfassung	2
III	Einleitung	4
1	Petrochemie und die Zukunft von Bioraffinerien	4
2	Itaconsäure	5
2.1	Chemische Synthese	7
2.2	Biotechnologische Herstellung	8
2.3	Biosyntheseweg	9
3	<i>cis</i> -Aconitat-Decarboxylase (CAD)	11
4	<i>Corynebacterium glutamicum</i> als Itaconat-Produzent	12
5	Ziele der Arbeit	13
IV	Material und Methoden	14
1	Puffer und Stammlösungen	14
2	Nährmedien	14
3	Oligonukleotide	15
4	Plasmide	18
5	Organismen	20
6	Stammhaltung von Bakterien	21
7	Kultivierung von Bakterienstämmen	22
7.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
7.2	Expressionskulturen	22
7.3	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	22
8	Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern	23
8.1	Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen	23
8.2	Bestimmung des pH-Wertes	23
8.3	Bestimmung organischer Säuren und von Glucose im Kultivierungsüberstand mittels HPLC	24

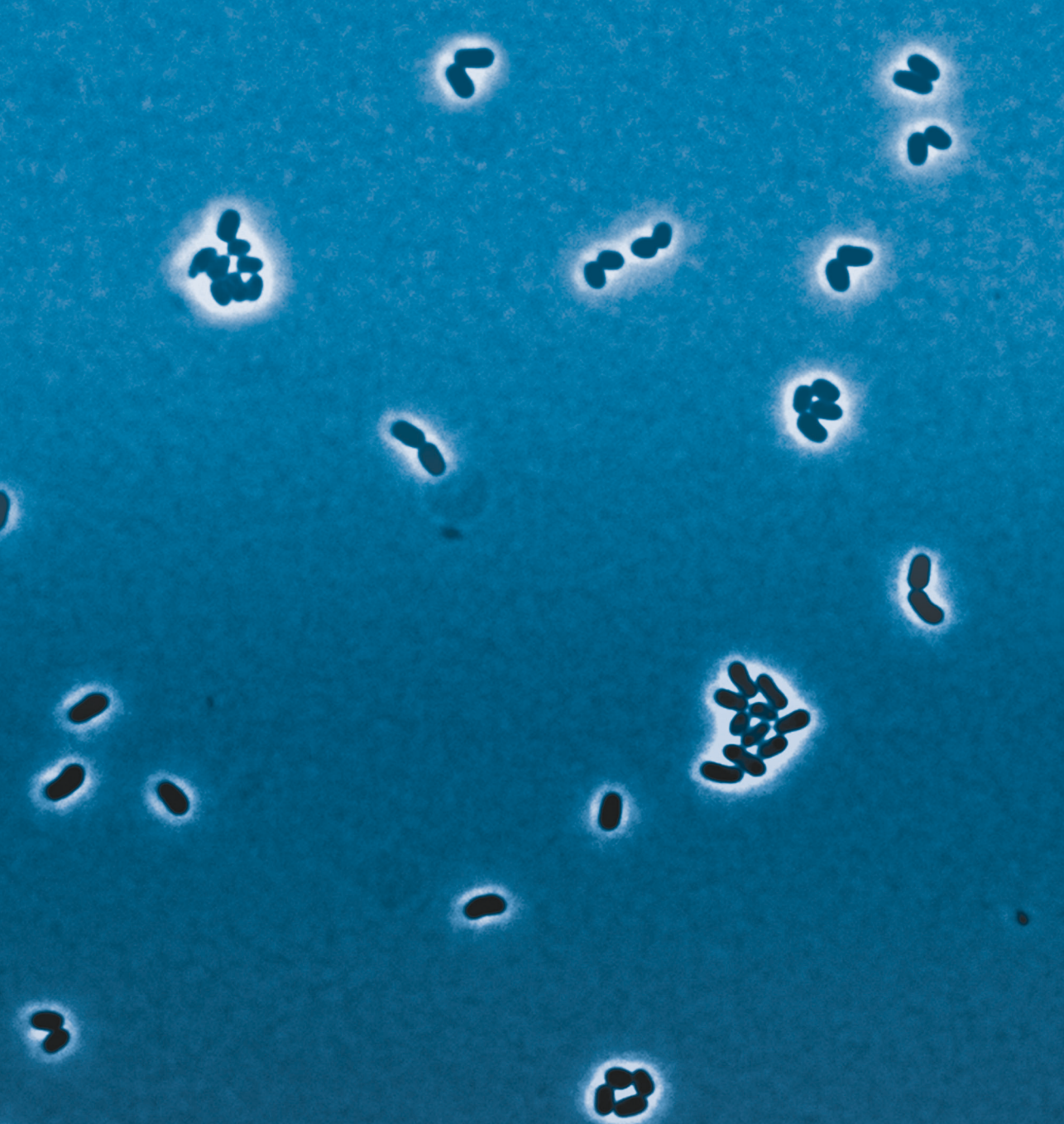
Inhaltsverzeichnis

8.4	Qualitative und quantitative Itaconat-Bestimmung.....	24
8.5	Bestimmung intrazellulärer Metabolite mittels HPLC	25
8.6	Bestimmung organischer Säuren mittels GC-TOF-MS	26
9	Molekularbiologische Methoden	27
9.1	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	27
9.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
9.3	Integration von Genen und Einführung chromosomaler Mutationen mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	28
10	DNA-Techniken.....	30
10.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
10.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i>	30
10.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
10.4	PCR-Purification-Kit.....	30
10.5	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	31
10.6	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	31
10.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
10.8	Kolonie-PCR.....	32
10.9	DNA-Sequenzanalyse	32
10.10	Restriktionsverdau	33
10.11	Ligation	33
10.12	Site-directed Mutagenese	33
10.13	Konstruktion von Plasmiden	33
11	Proteinbiochemische Methoden.....	35
11.1	Zellaufschluss mittels French-Press-Zelle	35
11.2	Zellaufschluss mittels Silamat	36
11.3	Proteinbestimmung nach Bradford	36
11.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
11.5	Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	37
11.6	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen	37
11.7	Enzymassays.....	38

V	Ergebnisse	40
1	Analyse der Itaconat-Toleranz von <i>C. glutamicum</i> und Fähigkeit zur Itaconat-Verstoffwechslung.....	40
2	Konstruktion und Analyse eines Itaconat-Produktionsstammes (1. Generation)	42
2.1	Analyse der Itaconat-Produktion von <i>C. glutamicum</i> /pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} und <i>C. glutamicum</i> /pEKEx2-MSMEG_6856	43
2.2	Heterologe Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung von N-His ₁₀ -MSMEG_6856 aus <i>Mycobacterium smegmatis</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	46
3	Versuche zur Erhöhung der intrazellulären <i>cis</i> -Aconitat-Konzentration mit Hilfe von 2-Methylcitrat-Dehydratasen.....	48
3.1	Heterologe Überproduktion und Reinigung von PrpD1-, PrpD2- und 2-Mcd2-Derivaten.....	48
3.2	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> /pEKEx2- <i>cad</i> _{opt} - <i>prpD2</i>	51
3.3	Austausch der corynebacteriellen Aconitase gegen heterologe Aconitasen	52
4	Steigerung der CAD-Aktivität mit Hilfe eines CAD-MalE-Fusionsproteins.....	53
5	Variation der Kultivierungsbedingungen für die Itaconat-Produktion	56
5.1	Kohlenstoffpulseexperimente	57
5.2	Stickstofflimitierung.....	57
6	Reduzierung der ICD-Aktivität zur Verbesserung der <i>cis</i> -Aconitat-Verfügbarkeit.....	60
6.1	Analyse der Stämme mit reduzierter ICD-Aktivität	61
7	Einfluss putativer Itaconat-Transporter aus <i>A. terreus</i> auf die Itaconat-Produktion mit <i>C. glutamicum</i>	64
8	Versuche zur Itaconat-Produktion bei Kultivierung in Bioreaktoren	65
VI	Diskussion	70
1	<i>C. glutamicum</i> als Wirtsorganismus für die Itaconat-Produktion.....	71
2	Konstruktion und Analyse der Produktionsstämme der 2. und 3. Generation	78
3	Schlussfolgerung und Perspektive	81
VII	Literaturverzeichnis	84

Inhaltsverzeichnis

VIII	Anhang	93
1	Gensequenz des für <i>C. glutamicum</i> Codon-Usage optimierten <i>cad</i> -Gens	93
2	Suche nach Homologen der <i>cis</i> -Aconitat-Decarboxylase (CAD)	93
3	Analyse der Codon-Usage des <i>cad</i> -Gens.....	95



Gesundheit / Health
Band / Volume 64
ISBN 978-3-89336-860-0

 **JÜLICH**
FORSCHUNGSZENTRUM