

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 Gendelektionen.....	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

1. Einleitung

Die industrielle Biotechnologie ist eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts. Sie ebnet den Übergang von der petrochemischen Industrie zu einer nachhaltigen Industrie basierend auf nachwachsenden Rohstoffen. Die weltweiten Erdölressourcen im Jahre 2015 wurden auf 570 Gigatonnen geschätzt (BGR, 2016). Bei einem aktuellen Verbrauch von 4,35 Gt/Jahr werden die Ressourcen vermutlich Ende des Jahrhunderts zum Erliegen kommen. Auch wenn der Erdölpreis in den letzten Jahren stark gefallen ist, ist mit Abnahme der Ölvorkommen auch mit einer deutlichen Preiszunahme zu rechnen. Neben diesem ökonomischen Aspekt sind auch die ökologischen Folgen von industriell genutztem Rohöl eine treibende Kraft für die Entwicklung nachhaltiger und umweltschonender Produktionsprozesse. Anders als die meisten chemischen Prozesse laufen biotechnologische Prozesse bei milden Temperaturen und unter Normaldruck ab, wodurch Energie eingespart werden kann (Tufvesson et al., 2010). Die Verwendung von nachwachsenden Ressourcen (Pflanzen) leistet zudem durch die Fixierung von CO₂ einen Beitrag zur Reduktion der Treibhausgasproduktion.

Per Definition beschäftigt sich die Biotechnologie mit *„der Anwendung von Wissenschaft und Technik auf lebende Organismen, Teile von ihnen, ihre Produkte und Modelle um lebende oder nichtlebende Materie zur Generierung von Wissen, Herstellung von Gütern oder Bereitstellung von Dienstleistungen zu verändern“* (OECD, 2005). Je nach Anwendungsgebiet wird zwischen roter, weißer, und grüner Biotechnologie unterschieden. In Deutschland kann die Hälfte der Biotechunternehmen der roten Biotechnologie zugeordnet werden (BIOCOM_AG, 2017), welche sich mit der Entwicklung von Medikamenten und diagnostischen Methoden beschäftigt. Die grüne Biotechnologie befasst sich mit der (genetischen) Veränderung von Pflanzen zur Optimierung der Erträge oder zur Erhöhung der Resistenz gegenüber suboptimalen Umweltbedingungen. In diesem Bereich sind in Deutschland nur 3 % der Biotechunternehmen aktiv. Bei der weißen (industriellen) Biotechnologie werden Organismen oder Bestandteile dieser (Enzyme) für die großtechnische Produktion eingesetzt. Klassische biotechnologische Produkte, welche bereits vor tausenden von Jahren hergestellt wurden, sind Käse, Bier, Wein und Brot. Die Entwicklung mikrobieller und molekularbiologischer Methoden in den letzten 150 Jahren ermöglichte es das Produktspektrum enorm zu erweitern, z.B. auf organische Säuren, Aminosäuren, Antibiotika, Vitamine, Biopolymere und Biokraftstoffe (Becker and Wittmann, 2015). In der industriellen Biotechnologie sind aktuell 10 % der deutschen Biotechnologieunternehmen aktiv (BIOCOM_AG, 2017). Die restlichen Biotechunternehmen sind keinem spezifischen Anwendungsgebiet (32 %) beziehungsweise der Bioinformatik (5 %) zuzuordnen.

Die deutsche chemische Industrie verwendete 2015 für 13 % der produzierten Chemikalien (ohne Kraftstoffe) nachwachsende Rohstoffe (VCI, 2017b). Bis zum Jahre 2030 wird eine Erhöhung des Anteils auf 18,5 % erwartet (VCI, 2017a). Der Einsatz nachwachsender Rohstoffe wird zum einen durch die Verfügbarkeit und den Preis der Rohstoffe eingeschränkt.

Zudem besteht eine Konkurrenz zur Nahrungsmittelindustrie. Außerdem muss die Effizienz der biobasierten Prozesse erhöht werden, um mit der petrochemischen Produktion konkurrieren zu können (Van Dien, 2013). Deshalb werden nachwachsende Rohstoffe zurzeit auch vorwiegend zur Produktion von Spezialchemikalien verwendet (VCI, 2017a). Grundchemikalien hingegen haben einen niedrigeren Marktpreis. Um den Herstellungspreis zu senken, ist daher die Erschließung alternativer Substrate aus Abfallströmen (Landwirtschaft, Industrie) erstrebenswert. Auch müssen die verwendeten Produktionsstämme diese Substrate effektiv in das jeweilige Produkt umwandeln. Hohe Ausbeuten, Titer und volumetrische Produktivitäten sind dabei die Schlüsselparameter für einen konventionellen Produktionsprozess (Van Dien, 2013). Bio-basierte Grundchemikalien werden auch als Plattformchemikalien bezeichnet. Durch chemische Veränderung der funktionalen Gruppen lassen sich diese in eine Vielzahl von neuen Produkten umwandeln. Das US-Energieministerium (DOE) veröffentlichte im Jahr 2004 eine Liste der 12 aussichtsreichsten potentiellen Plattformchemikalien, die aus Zuckern gewonnen werden können (Werpy and Petersen, 2004). Diese enthielt organische Säuren (Succinat, Fumarat, Malat, Itaconat etc.), Aminosäuren (Aspartat, Glutamat), Alkohol (Glycerin) und Zuckeralkohole (Sorbitol, Xylitol, Arabitol). Kommerzialisiert wurden bereits die Produktion von Succinat, Glutamat, Itaconat, Sorbitol, Glycerol, Lävulinsäure, 2,5-Furandicarbonsäure und Xylitol (Choi et al., 2015; Werpy and Petersen, 2004). Um das Marktpotential voll auszuschöpfen ist jedoch eine Verbesserung der Produktionsprozesse notwendig. So ist beispielsweise nur 3 % des produzierten Succinats biobasiert (1200 t). Im Falle von Itaconat erfolgt die Produktion (41000 t) zwar ausschließlich biotechnologisch, jedoch wird damit nur die Hälfte der verfügbaren Produktionskapazität (80000 t) ausgeschöpft (Weastra, 2013). Grund für die geringe Auslastung sind die hohen Produktionskosten und der bislang begrenzte Markt. Letzterer könnte durch die chemische Umsetzung des Itaconats zu Polyitaconat oder Methylmethacrylat erweitert werden (Choi et al., 2015). Für die Senkung der Produktionskosten muss der Bioprozess optimiert werden. Die Produktion kann durch die Wahl günstiger Substrate und die Optimierung des Produktionsorganismus sowie der Kultivierungsbedingungen (Medienzusammensetzung, Begasung etc.) optimiert werden (*upstream processing*). Wesentlich zu den Produktionskosten trägt auch die anschließende Aufreinigung des Produktes aus der Fermentationsbrühe (*downstream processing*) bei (Van Dien, 2013).

Der mikrobielle Metabolismus beinhaltet Moleküle mit den unterschiedlichsten funktionalen Gruppen. Somit ist es theoretisch möglich eine Vielzahl an industriell relevanten Produkten biotechnologisch herzustellen (Zhang et al., 2016). Durch Verwendung von neuen synthetischen Reaktionen kann zudem das natürliche Repertoire um synthetische Produkte erweitert werden (Erb et al., 2017). Am Anfang jedes biotechnologischen Prozesses steht die Auswahl eines geeigneten Produktionsorganismus. Zu Beginn wurden natürliche Produzenten aus der Natur isoliert und anschließend durch Behandlung mit UV-Licht oder mutagene Substanzen mutiert. Zwar konnten dadurch die Produktionseigenschaften erheblich verbessert werden, jedoch akkumulierten solche Stämme meist bis zu tausend Mutationen, von denen nur wenige für die verbesserte Produktion verantwortlich sind (Becker and Wittmann, 2015). Die

unnötigen Mutationen führen oft zu einem verringerten Wachstum, einer verringerten Stresstoleranz oder zu einem erhöhten Nährstoffbedarf und wirken sich somit nachteilig auf die Performance aus (Becker and Wittmann, 2015). Durch die rasante Entwicklung der genetischen Methoden und der kostengünstigen Synthese ganzer Gencluster sind bei der Wahl des Produktionsorganismus heutzutage jedoch nahezu keine Grenzen gesetzt (Lee and Kim, 2015). Besonders die in den letzten Jahren entwickelte universell einsetzbare CRISPR-Technologie ermöglicht auch die genetische Veränderung von Organismen, die bislang nicht oder nur schwer zugänglich waren (Doudna and Charpentier, 2014). Durch die entwickelten molekularbiologischen Methoden wurde zudem eine gezielte Veränderung des Stoffwechsels, die auch als *Metabolic Engineering* bezeichnet wird, möglich (Bailey, 1991). Die Stammkonstruktion erfolgt dabei in iterativen Zyklen bestehend aus Design, Implementierung und Analyse geeigneter Interventionen (Bailey, 1991). Intuitive Targets für die Optimierung von Produktionsorganismen sind die Überexpression ratenlimitierender Enzyme des Produktionsweges, die Deletion konkurrierender Stoffwechselwege oder die Entfernung von Feedback-Regulationen. Da eine Optimierung des Produktionsweges oft nicht ausreicht, ist zusätzlich eine Optimierung der Cofaktor-Verfügbarkeit erforderlich, welche häufig eine globale Anpassung des Stoffwechsels erfordert. Hierfür ist eine systemweite Betrachtung des Stoffwechsels mit Hilfe von Netzwerkmodellen von großem Vorteil, da Cofaktoren meist an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt sind, und zudem eine geschlossene Redox- und Energiebilanz gewährleistet werden muss (Lee and Kim, 2015). Durch die kostengünstige Sequenzierung von ganzen Genomen stehen heute immer mehr großskalige Stoffwechselmodelle zur Verfügung, die mehrere Tausend Reaktionen und Metabolite umfassen können (Kim et al., 2015). Neue Algorithmen wurden entwickelt, um solche Netzwerke zu analysieren, Targets für das Metabolic Engineering zu berechnen und komplexe Datensätze (OMICS) zu integrieren (Becker and Wittmann, 2015; Hansen et al., 2017). Die Verwendung dieser Methoden mündete unter anderem in Stämmen zur Produktion von Aminosäuren (L-Valin, L-Threonin, L-Lysin und L-Arginin), Massenchemikalien (1,4-Butandiol, 1,4-Diaminobutan, 1,5-Diaminopentan, 1,3-Propandiol, Butanol, Isobutanol und Succinat) sowie Medikamenten (Artemisinin) (Lee and Kim, 2015). Gängige Produktionsorganismen („Arbeitspferde“) sind vor allem *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* und *Saccharomyces cerevisiae* (Becker and Wittmann, 2015).

Escherichia coli ist das wohl am besten charakterisierte Bakterium. Es ist aufgrund der Fähigkeit auf verschiedenen Kohlenstoffquellen unter aeroben oder anaeroben Bedingungen zu wachsen ein wichtiger Organismus für die industrielle Produktion (Becker and Wittmann, 2015). Das Bakterium wurde unter anderem für die Produktion der organischen Säuren D-Laktat (Zhu et al., 2007), Succinat (Chen et al., 2014) und Malat (Zhang et al., 2011), der Aminosäuren L-Lysin (Ying et al., 2014) und L-Threonin (Lee et al., 2007), der Alkohol Ethanol (Ohta et al., 1991), Butanol (Shen et al., 2011) und 1,3-Propandiol (Nakamura and Whited, 2003), sowie für die Produktion von Polyhydroxyalkanoat (Zhuang et al., 2014) optimiert. In dieser Arbeit sollte *E. coli* für die Produktion von Itaconat gentechnisch verändert

werden. Die Plattformchemikalie Itaconat wird bislang im industriellen Maßstab mit dem Pilz *Aspergillus terreus* hergestellt (Willke and Vorlop, 2001). Auch wenn der aktuelle Produktionsprozess hohe Titer und Ausbeuten ermöglicht, so ist die Produktivität durch das langsame Wachstum des Pilzes begrenzt. Hinzu kommt die hohe Sensitivität der Itaconatproduktion gegenüber der Sauerstoffversorgung (Kuenz et al., 2012). *E. coli* hingegen erreicht hohe Wachstumsraten und kann auch unter Sauerstoffausschluss wachsen. Die Itaconatproduktion in *A. terreus* erfolgt ausgehend vom TCA-Zyklus durch Decarboxylierung von cis-Aconitat (Bonname et al., 1995). Das katalysierende Enzym, die cis-Aconitat-Decarboxylase sowie das entsprechende Gen wurden 2008 durch Kanamasa und Kollegen identifiziert und charakterisiert (Kanamasa et al., 2008). Die heterologe Expression des Gens ermöglichte erstmals die Produktion von Itaconat in *E. coli* (Okamoto et al., 2014; Vuoristo et al., 2015a), *Saccharomyces cerevisiae* (Blazeck et al., 2014), *Corynebacterium glutamicum* (Ottens et al., 2015), *Aspergillus niger* (Li, 2012) und *Yarrowia lipolytica* (Blazeck et al., 2015). Die erreichten Titer und Ausbeuten waren jedoch zu gering um mit der nativen Itaconatproduktion von *A. terreus* zu konkurrieren. Offensichtlich sind weitere Veränderungen nötig um die Flüsse in den betreffenden Stämmen zum Itaconat umzuleiten. In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt die Itaconatausbeute von *E. coli* über einen modellbasierten Ansatz zu verbessern, und anschließend die Produktivität durch adaptive Evolution zu optimieren. Eine weitere Fragestellung war, ob eine wachstumsgekoppelte Synthese oder eine entkoppelte Produktbildung für die Produktion im Fermenter zu bevorzugen ist.

In Abbildung 1 sind die wesentlichen Ziele und Arbeitspakete der Arbeit dargestellt. Im ersten Schritt erfolgte zunächst die Optimierung der Itaconatproduktion über einen modellgestützten Ansatz basierend auf einem stöchiometrischen Zentralstoffwechselmodell (Abschnitt 4.4). Um Stammdesignstrategien für eine wachstumsgekoppelte Produktion von Itaconat zu bestimmen, wurde das Konzept der constrained Minimal Cut Sets (Hädicke and Klamt, 2011) angewendet. Minimal Cut Sets schränken den Metabolismus durch die Deletion von Reaktionen mittels Gendeletionen so weit ein, dass nur noch das gewünschte Verhalten (Wachstum gekoppelt mit hoher Produktausbeute) möglich ist (Abbildung 1). Dies gilt jedoch nur solange wie der Phänotyp des jeweiligen Stammes durch das Modell wiedergegeben wird. Wird in Folge einer Gendelektion (Knockout) ein neues (Neben-)Produkt gebildet, so entstehen neue Lösungen, die zu berücksichtigen sind. Daher wurde hier ein iterativer Ansatz gewählt, der eine Anpassung des Modells nach Implementierung der einzelnen Knockouts erlaubte. Ist durch die Implementierung geeigneter Interventionen somit eine wachstumsgekoppelte Produktion etabliert, so kann der Stamm anschließend durch adaptive Evolution auf Wachstum optimiert werden. Hiermit beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit (Abschnitt 4.5). Über die Sequenzierung der Genome adaptierter Stämme sollten zudem Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche verbliebenen Stoffwechselwege schnelleres Wachstum ermöglichen.

Im dritten Arbeitspaket (Abschnitt 4.6) sollte dann ein wachstumsentkoppelter Prozess, ein sogenannter zweistufiger Prozess etabliert werden um die volumetrische Produktivität der Itaconatsynthese zu optimieren. Die volumetrische Produktivität ist ein wichtiger Parameter für industrielle Prozesse, da durch sie die benötigte Reaktorgröße definiert wird (Van Dien, 2013). Generell ist es nicht möglich gleichzeitig die Produktivität und die Ausbeute zu optimieren (Zhuang et al., 2013). Für eine hohe Produktivität wird eine ausreichende Zelldichte benötigt. Durch die Optimierung der Produktausbeute werden jedoch Ressourcen von der Biomassebildung zur Produktbildung umgeleitet. Beim zweistufigen Prozess werden nun Biomassebildung und Produktbildung entkoppelt. Das bedeutet, dass der Stamm in der ersten Stufe, der Wachstumsphase, für die Bildung von Biomasse optimiert ist. Die Produktbildung erfolgt dann in der zweiten Phase, in der das Zellwachstum stagniert. Um nun die Itaconat- und die Biomasseproduktion zu entkoppeln, sollte basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 4.4 ein für das Wachstum essentieller Stoffwechselweg dynamisch mittels temperaturabhängiger Genregulation extern gesteuert werden. Eine Aktivierung dieses Stoffwechselweges ermöglicht dann Wachstum, wohingegen die Inaktivierung das Wachstum in der zweiten Stufe inhibiert und die Produktbildung ermöglicht.

Wesentliche Resultate dieser Arbeit wurden in den folgenden Zeitschriftenartikeln veröffentlicht:

Harder, B. J., Bettenbrock, K., Klamt, S., 2016. Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 38, 29-37.

Harder, B. J., Bettenbrock, K., Klamt, S., 2018. Temperature-dependent dynamic control of the TCA cycle increases volumetric productivity of itaconic acid production by *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 115, 156-164.

Auf eine Zitierung dieser Artikel wird im Folgenden verzichtet.

2. Theoretische und biologische Grundlagen

2.1. Itaconat

2.1.1. Eigenschaften und Anwendungen

Itaconsäure, im Folgenden mit dem häufig verwendeten Begriff Itaconat (Salz der Itaconsäure) bezeichnet, ist eine ungesättigte geruchslose Dicarbonsäure, welche erstmals durch Baup als Nebenprodukt der Destillation von Citronensäure beschrieben wurde. Die Säure kristallisiert leicht in kalter Lösung, ist geruchslos und hat einen Schmelzpunkt von 160 °C (Baup, 1836). Die Löslichkeit der weißen Kristalle der Itaconat, welche mit der Temperatur zunimmt, beträgt in Wasser bei 20 °C 81,1 g/l (Apelblat and Manzurola, 1997; Baup, 1836). Itaconat hat ein Molekulargewicht von 130,1 g/mol ($C_5H_6O_4$) und kann in drei Protonierungszuständen vorliegen (pKs: 3,84 und 5,55). Die Struktur der vollständig protonierten Säure kann der Abbildung 2 entnommen werden.

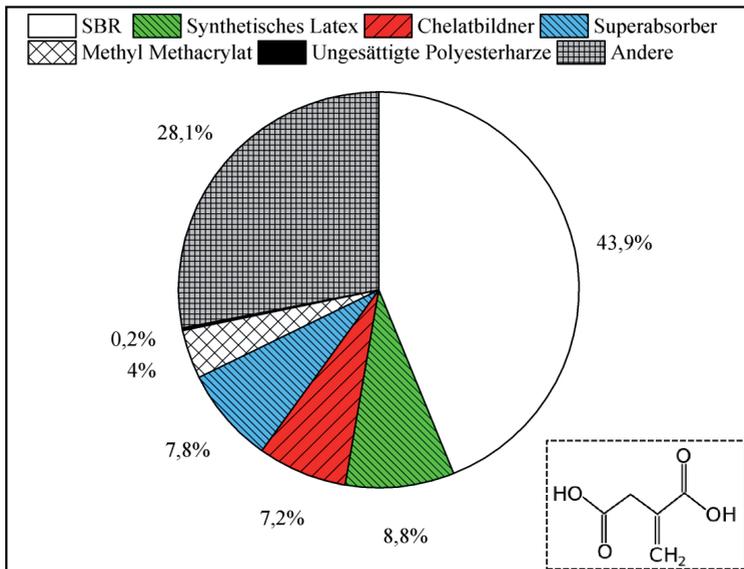


Abbildung 2: Anteil unterschiedlicher Anwendungsbereiche von Itaconat an der Gesamtproduktion von 41.000 t im Jahr 2011 nach Weastra (2013). SBR = Styrol-Butadien-Kautschuk. Die chemische Strukturformel von Itaconat ist in der rechten unteren Ecke zu sehen.

Da Itaconat chemisch weiter modifiziert werden kann und somit eine Reihe von verschiedenen petrochemisch produzierten Chemikalien ersetzen könnte, wurde es im Jahre 2004 in einer Studie des US Energieministerium (DOE) als eine der 12 „*Top value-added chemicals from biomass*“ klassifiziert (Werpy and Petersen, 2004). Im Jahre 2011 wurden 41.000 t Itaconat mit

einem entsprechenden Marktwert von 74,5 Mio \$ bei einer Produktionskapazität von 80.000 t pro Jahr produziert. Die geringe Auslastung der Produktionsanlagen ist auf die relativ hohen Produktionskosten im Vergleich zum Marktpreis von 1,8-2 \$/kg und den bislang begrenzten Markt zurückzuführen (Weastra, 2013). Ein Hauptanwendungsgebiet der Itaconat ist die Polymerindustrie (Abbildung 2). Durch radikalische Polymerisation z.B mit Persulfat bildet sich Polyitaconat, welches gut wasserlöslich ist (Marvel and Shepherd, 1959). Die gute Löslichkeit macht es interessant für eine Vielzahl von Anwendungen beispielsweise als Superabsorber, als Chelatbildner für die Wasserbehandlung oder als Dispersionsmittel. Für die Anwendung als Chelatbildner in Geschirrspülmittel oder als Polymer in Haarsprays ergeben sich bereits Vorteile hinsichtlich der Produktionskosten oder der Anwendungseigenschaften (Itaconix, 2017). Die Verwendung anstelle der petrochemisch basierten Polyacrylsäure wäre nach einer Halbierung der Produktionskosten ökonomisch sinnvoll (Itaconix, 2009). Bislang findet Itaconat jedoch vorwiegend als Copolymer für die Produktion von Styrol-Butadien-Kautschuk (SBR) und Acrylatlatex Einsatz. Kunstharze basierend auf der Reaktion von Itaconat mit Acrylsäure oder Methacrylsäure können für die Beschichtung verschiedenster Ausgangsmaterialien verwendet werden (Weastra, 2013). Weitere Anwendungsgebiete von Itaconat finden sich im medizinischen und kosmetischen Sektor (Willke and Vorlop, 2001). In der Marktanalyse von Weastra wurde der potentielle Markt von Itaconat auf 6,16 Mio t mit einem Marktwert von 11,1 Mrd \$ beziffert. Als Hauptwachstumsmärkte werden phosphatfreie Waschmittel (1,89 Mio t), Methylmethacrylat (1,89 Mio t), Superabsorber (1,61 Mio t) und ungesättigte Polyesterharze (0,95 Mio t) gesehen. Eine Kommerzialisierung der Methylmethacrylatproduktion basierend auf der Decarboxylierung von Itaconat mit anschließender Veresterung könnte bereits zu einer gesteigerten Nachfrage und somit zu einer Produktion von 407.790 t Itaconat im Jahr 2020 führen (Choi et al., 2015; Weastra, 2013).

2.1.2. Biosynthesewege

Der Biosyntheseweg zu Itaconat war lange umstritten. Zwar stellte bereits Kinoshita im Jahre 1932 die Hypothese auf, dass Itaconat ausgehend von Citrat und cis-Aconitat produziert wird, jedoch konnte keine Produktion ausgehend von Citrat nachgewiesen werden (Calam et al., 1939; Kinoshita, 1932). Dabei gab es etwas später bereits deutlich Indizien, die für die Produktion über den Citronensäurezyklus (TCA-Zyklus) sprachen. So zeigten Bentley und Thiessen, dass *A. terreus* Enzyme besitzt, die cis-Aconitat zu Itaconat und CO₂ umsetzen (Bentley and Thiessen, 1955). Die gleichen Autoren identifizierten in Markerexperimenten die Glykolyse als Hauptweg für die Itaconatproduktion. Zudem zeigten sie, dass Succinat in Richtung Itaconat verstoffwechselt wird (Bentley and Thiessen, 1957). Dennoch hielten sich lange zwei alternative Theorien, die a) die Synthese über Citramalat oder b) die Synthese über 1,2,3-Tricarboxypropionsäure vorsahen. Citramalat wurde jedoch nie in Kulturen von *Aspergillus terreus* nachgewiesen und der Propionsäure-Weg, welcher zwar die Decarboxylierung von cis-Aconitat beinhaltet, jedoch von der Stöchiometrie nicht zu den

publizierten Ausbeuten passt (Bonname et al., 1995). Experimente mit C^{14} -markierten Vorstufen (Glucose, Pyruvat, Citrat und Acetat) wiederlegten schließlich den Citramalat-Weg und belegten die Synthese von Itaconat über den TCA-Zyklus (Bonname et al., 1995). Glucose wird dabei über die Glykolyse zu zwei Molekülen Pyruvat verstoffwechselt, wovon eines im Mitochondrium zu Acetyl-CoA umgesetzt wird, während das Andere zunächst im Cytosol zu Oxalacetat carboxyliert und dann zu Malat reduziert wird (Abbildung 3). Malat wird vermutlich durch einen cis-Aconitat-Malat-Antiporter ins Mitochondrium transportiert, welcher im Austausch cis-Aconitat ausschleust (Jaklitsch et al., 1991). Das über den TCA gebildete cis-Aconitat wird dann im Cytosol durch die cis-Aconitat-Decarboxylase zu Itaconat umgewandelt und anschließend durch einen Membrantransporter exportiert.

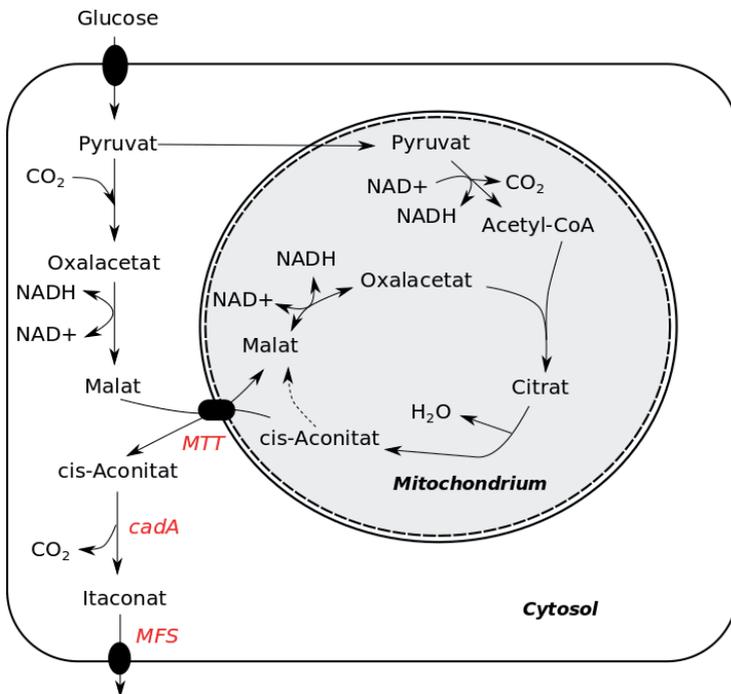


Abbildung 3: Itaconatbiosynthese in *Aspergillus terreus*. Die drei Gene des Itaconatbiosyntheseweges sind rot hervorgehoben: *MTT* = Mitochondrialer Tricarbonsäuretransporter, *cadA* = cis-Aconitat Decarboxylase und *MFS* = Major-Facilitator Transporter. Während die Glykolyse nahezu vollständig im Cytoplasma lokalisiert ist, befinden sich die Enzyme für den Citronensäurezyklus hingegen im Mitochondrium. Für die Itaconatsynthese findet vermutlich der Austausch der Precursor zwischen dem Cytosol und dem Mitochondrium über den mitochondrialen Tricarbonsäuretransporter statt, welcher Malat und cis-Aconitat im Antiport transportiert. Die Synthese von Malat aus cis-Aconitat erfolgt im Mitochondrium durch 5 Reaktionen welche hier durch den gestrichelten Pfeil angedeutet sind.

Die cis-Aconitat-Decarboxylase ist ein 55 kDa großes Enzym, welches eine geringe Affinität für cis-Aconitat besitzt ($K_m = 2,45 \text{ mmol/l}$ bei pH 6,2 und 37 °C), ein pH- und Temperaturoptimum von 6,2 und 45 °C aufweist, und in Extrakten von *A. terreus* eine Aktivität von 0,5-1,5 U/mg Protein zeigt (Dwiarti et al., 2002). Kanamasa und Kollegen identifizierten im Jahre 2008 das Gen, welches für die cis-Aconitat-Decarboxylase in *Aspergillus terreus* codiert. Die 1529 bp lange Sequenz ist durch ein 56 bp Intron unterbrochen und codiert für 490 Aminosäuren (Kanamasa et al., 2008). Durch Transkriptomanalyse wurde etwas später das Gencluster für die Itaconatproduktion identifiziert. Dieses enthält 4 Gene, ein Gen, das für ein Zinkfingerprotein (ATEG_09969) und somit einen möglichen Regulator codiert, jeweils ein Gen für einen mitochondrialen Tricarbonsäureexporter (ATEG_09970, *mttA*) und für einen Major-Facilitator Transporter (ATEG_09972, *MFS*) und das Gen für die cis-Aconitat-Decarboxylase (*cadA*) (Li et al., 2011). Durch Überexpression von *mttA* in *Aspergillus niger* zeigte sich, dass dieser sehr wahrscheinlich selektiv cis-Aconitat und nicht Citrat aus dem Mitochondrium transportiert (Steiger et al., 2016). Wie die Gene des Itaconatclusters unter Produktionsbedingungen hochreguliert werden, ist noch ungeklärt (Kanamasa et al., 2008; Li et al., 2011).

Neben dem Biosyntheseweg besitzt *Aspergillus terreus* auch einen Abbauweg, bei dem zunächst Coenzym A von Succinyl-CoA durch die Itaconyl-CoA-Transferase auf Itaconat übertragen wird. Dem folgt die Hydrierung zu Citramalyl-CoA durch die Itaconyl-CoA-Hydratase mit anschließender Spaltung zu Acetyl-CoA und Pyruvat durch die Citramalyl-CoA-Lyase (Chen et al., 2016).

Kürzlich wurde zudem ein leicht veränderter Biosyntheseweg in dem Pilz *Ustilago maydis* identifiziert, bei dem in einem Zwischenschritt cis-Aconitat durch eine Aconitat- Δ -Isomerase zu trans-Aconitat umgewandelt wird und anschließend zu Itaconat decarboxyliert wird (Geiser et al., 2016).

2.1.3. Mikrobielle Produktion

Produktion mit *Aspergillus terreus*

Aufgrund der geringen Preisdifferenz zwischen Itaconat und Citrat, und der geringen Ausbeuten der chemischen Synthese, erfolgt die Produktion ausschließlich biotechnologisch mit dem Pilz *Aspergillus terreus* (Cordes et al., 2015; Klement and Buchs, 2013). So ermöglicht beispielsweise ein von Pfizer & Co. aus dem Jahre 1962 entwickelter Batch-Prozess die Produktion von 71 g/l Itaconat aus 150 g/l Zucker (Rohrzuckermelasse) innerhalb von 4 Tagen (Nubel and Ratajak, 1962). Nachteilig ist jedoch die starke Abhängigkeit der Produktion von den Prozessbedingungen, weshalb die publizierten Titer selbst für gleiche Stämme sehr stark schwanken (Okabe et al., 2009). Wichtige Faktoren, die die Itaconatproduktion mit *A. terreus* beeinflussen, sind die Medienzusammensetzung, der pH-Wert und die Sauerstoffverfügbarkeit.

Kuenz et al. erzielten mit drei unterschiedlichen *A. terreus* Stämmen durch ein optimiertes Medium mit Glucose (180 g/l) als C-Quelle reproduzierbare Itaconattiter von 90 g/l (Kuenz et al., 2012). Ein charakteristischer Kultivierungsverlauf kennzeichnet sich durch eine Wachstumsphase von 1,5 Tagen, während der nur geringe Mengen Itaconat (ca. 5 g/l) gebildet werden und der pH-Wert auf 2 abfällt. Dem schließt sich die Produktionsphase von 5,5 Tagen unter phosphatlimitierenden Bedingungen an (Kuenz et al., 2012). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass die Phosphatlimitierung nicht entscheidend für die Itaconatproduktion ist (Hevekerl et al., 2014a). Vielmehr wird durch sie die Biomasseproduktion beeinflusst (Hevekerl et al., 2014a; Kuenz et al., 2012).

Bezüglich der Sauerstoffabhängigkeit zeigten mehrere Studien, dass eine kurze Unterbrechung der Begasung für 5-10 Minuten den Titer drastisch reduziert (Gyamerah, 1995b; Kuenz et al., 2012). Die Instabilität der cis-Aconitat-Decarboxylase und die langsame Neusynthese der Proteine verzögern die Regeneration der Itaconatsynthese nach Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung (Cordes et al., 2015; Gyamerah, 1995b). Gyamerah zeigte zudem, dass die mitochondriale ATP-Produktion wichtig für die Itaconatproduktion ist. Eine Hemmung der Plasmamembran ATPase hatte hingegen keine inhibierende Wirkung auf die Itaconatproduktion. Er schlussfolgerte, dass Itaconat zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes unter Verbrauch von ATP aus der Zelle transportiert wird (Gyamerah, 1995b). Eine etwas verringerte Störung der Itaconatproduktion durch Sauerstofflimitierung konnte durch die heterologe Expression des *Vitreoscilla* Hämoglobins erreicht werden (Lin et al., 2004). Die Versorgung mit Sauerstoff hängt bei filamentösen Pilzen des Weiteren von der Morphologie ab, welche durch Medienkomponenten und der Rührerdrehzahl beeinflusst werden kann (Krull et al., 2013). Optimal für die Itaconatproduktion mit *A. terreus* sind kleine lockere Pellets mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 mm (Gyamerah, 1995a; Kuenz et al., 2012).

Die Löslichkeit von Itaconat im Fermentationsmedium steigt mit zunehmenden pH-Wert von 122 g/l bei pH 2 auf 131-166 g/l bei einem pH zwischen 2,5 und 3 (Hevekerl et al., 2014b). Wird bereits zu Beginn der Kultivierung von *Aspergillus terreus* der pH bei 3 geregelt, so hemmt dies die Itaconatproduktion (Hevekerl et al., 2014b). Ein Abfall des externen pH-Wertes auf 2 zu Beginn der Kultivierung, unabhängig vom initialen pH (2,4-5,9) (Gyamerah, 1995a; Hevekerl et al., 2014b) erscheint somit essentiell für die Itaconatproduktion. Der bislang höchste Titer von 160 g/l Itaconat (Tabelle 1) wurde durch einen initialen pH von 3,1 erzielt, welcher zunächst bis auf pH 1,6 abfiel und nach 2 Tagen auf 3,4 geregelt wurde (Krull et al., 2017).

Hinsichtlich der physiologischen Rolle der Itaconatproduktion von *Aspergillus terreus* wird vermutet, dass die Ausscheidung von Itaconat aufgrund der Senkung des externen pH-Wertes sowie der inhibierenden Eigenschaften von Itaconat auf bestimmte metabolische Wege dem Pilz einen Vorteil gegenüber konkurrierenden Mikroben verschafft (Cordes et al., 2015). So kann Itaconat inhibierend auf die Isocitratlyase (Glyoxylatzyklus (Williams et al., 1971)), die Propionyl-CoA-Carboxylase (Citramalatzzyklus (Berg et al., 2002)), die

Fructose-6-phosphat-2-Kinase (Glykolyse (Sakai et al., 2004)) und die Succinatdehydrogenase (TCA (Cordes et al., 2016)) wirken. Bei höheren Itaconatkonzentrationen kann in *Aspergillus terreus* eine feedback-Inhibierung der Itaconatproduktion beobachtet werden (Cordes et al., 2015). Ein Stamm mit erhöhter Resistenz gegenüber hohen Itaconatkonzentrationen wurde über eine Konzentrationsgradientenagarplatte isoliert und zeigte eine verbesserte Itaconatproduktion (Yahiro et al., 1995).

Für die Optimierung mikrobieller Produktionsprozesse werden häufig stoffwechselspezifische Enzyme überexprimiert. Eine verbesserte Produktivität konnte mit *Aspergillus terreus* durch gleichzeitige Überexpression von *cadA* und *mfsA* erzielt werden (Huang et al., 2014). Eine modifizierte 6-Phosphofruktokinase aus *A. niger*, welche nicht durch Citrat inhibiert wird, führte zu verdoppelter Produktion in der Studie von Tevž et al. (2010) wohingegen Huang et al. (2014) keine signifikante Änderung beobachten konnte.

Andere natürliche Produzenten

Die Biosynthese von Itaconat konnte auch in den Pilzen *Aspergillus itaconicus* und *Ustilago maydis*, in der Hefe *Pseudozyma antarctica* NRRLY-7808, sowie in murinen Makrophagen nachgewiesen werden (Haskins et al., 1955; Kinoshita, 1932; Levinson et al., 2006; Strelko et al., 2011). Sowohl *P. antarctica* als auch *Ustilago maydis* produzieren Itaconat unter Stickstofflimitierung mit Titern von 30 bzw. 44,5 g/l und Ausbeuten von 0,55 bzw. 0,33 mol/(mol Glucose) (Levinson et al., 2006; Maassen et al., 2014). In Makrophagen kommt es infolge von bakteriellen Infektionen zu der intrazellulären Akkumulation von 8 mM Itaconat (Michelucci et al., 2013).

Heterologe Itaconatproduktion

In den vergangenen Jahren gab es vermehrt Ansätze zur heterologen Expression in industriell etablierten Produktionsorganismen wie *Aspergillus niger*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Corynebacterium glutamicum* (Tabelle 1) mit dem Ziel die Produktivität zu verbessern und die Abhängigkeit von den Prozessparametern bzw. Medienkomponenten zu verringern.

Naheliegend ist die Produktion mit *Aspergillus niger*, welcher industriell für die Produktion von Citrat mit hohen Titern von 110-140 g/l und hoher Ausbeute von 70-90 % eingesetzt wird (Max et al., 2010). Die Expression von *cadA* in *A. niger* ermöglichte die Produktion von 0,6 g/l Itaconat (Li et al., 2011). Eine verbesserte Produktion von 12,96 g/l wurde durch Verwendung eines codonoptimierten *cadA* und durch Expression der Transporterproteine MTT und MFS erzielt (Hossain et al., 2016). Die zusätzliche Expression einer durch Transkriptomanalyse identifizierten potentiellen cytosolischen Citratsynthase (CitB) führte zu einer Verdoppelung der Produktion auf 26,2 g/l Itaconat mit einer Ausbeute von 0,51 mol/(mol Glucose) (Hossain et al., 2016). Als Nachteil erwies sich jedoch die stark hemmende Wirkung von bereits niedrigen Itaconatkonzentrationen (10 g/l) auf das Wachstum von *Aspergillus niger* (Hossain et al., 2016).

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Itaconatproduktionsstämme bezüglich Titer und Ausbeute mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Abkürzungen: MM = Minimalmedium, HE = Hefextrakt, ÜE = Überexpression, VE = Verminderte Expression, K = Komplexmedium.

Stamm	Genetische Intervention	Kultivierung	Titer [g/l]	Ausbeute [mol/mol]	Referenz
<u>A. terreus</u>					
DSM 23081	Keine	MM, 7 Tage	86,2	0,86	(Kuenz et al., 2012)
DSM 23081	Keine	MM, pH-Shift/Kontrolle, 12 Tage	160	0,78	(Krull et al., 2017)
DSM 23081	Keine	MM, pH-Shift/Kontrolle, 5 Tage	129	0,80	(Hevekerl et al., 2014b)
<u>Pseudozyma antarctica</u>					
NRRL Y-7808	Keine	MM + HE	30	0,55	(Levinson et al., 2006)
<u>Ustilago maydis</u>					
MB215	Keine	MM + HE, 6 Tage	44,5	0,33	(Maassen et al., 2014)
<u>Aspergillus niger</u>					
AB 1.13 CAD pyr+ 4.1	ÜE <i>cadA</i>	MM, 7 Tage	2	≈ 0,03	(Li, 2012)
AB1.13 CAD + MFS + MTT + CitB #99	ÜE <i>cadA</i> , <i>mfsA</i> , <i>mttA</i> und <i>citB</i>	MM, 5 Tage	26,2	0,51	(Hossain et al., 2016)
<u>E. coli</u>					
SO11	Δicd ÜE <i>cadA</i> und <i>acnB</i>	K, 4,5 Tage	4,34	≈ 0,20	(Okamoto et al., 2014)
BW25113 (DE3) $\Delta pta \Delta ldhA$ pKV-CGA	ÜE <i>glpA</i> , <i>acnA</i> und <i>cadA</i>	MM, 3 Tage	0,69	0,09	(Vuoristo et al., 2015a)
BW25113 (DE3) $\Delta pta \Delta ldhA$ pKV-CGA	ÜE <i>glpA</i> , <i>acnA</i> und <i>cadA</i>	MM, 3 Tage aerob/anaerob	0,38	0,06	(Vuoristo et al., 2015b)
BW25113 Δicd pPC168 pGC7	Δicd , ÜE <i>cadA</i> , <i>acnB</i> , <i>glpA</i> und <i>pyc</i>	K, 3 Tage	18	≈ 0,42	(Chang et al., 2017)
<u>Corynebacterium glutamicum</u>					
AO-2/pEKEx2-malE _{cad} _{opt}	VE <i>icd</i>	MM, 3 Tage	7,8	0,4	(Otten et al., 2015)

Die Überexpression von *cadA* in *Escherichia coli* führte nur zu geringen Konzentrationen von 30-247 mg/l Itaconat (Li et al., 2011; Okamoto et al., 2014; Vuoristo et al., 2015a). Ein Stamm

ohne Isocitratdehydrogenase und mit erhöhter Expression der Aconitase (AcnB) produzierte 4,34 g/l Itaconat innerhalb von 105 h, mit einer Ausbeute von ca. 0,2 mol/(mol Glucose) (Okamoto et al., 2014). Vuoristo verringerte die Bildung von Nebenprodukten durch Deletion der Gene *pta* (Phosphotransacetylase) und *ldhA* (Laktatdehydrogenase) und verstärkte den Fluss zu Itaconat durch die Expression der codonoptimierten Gene *gltA* (Citratsynthase) und *acnA* (Aconitase) aus *Corynebacterium glutamicum*. Dieses führte unter aeroben Bedingungen zur Produktion von 0,69 g/l Itaconat mit einer Ausbeute von 0,09 mol/(mol Glucose) und unter anaeroben Bedingungen (mit Stickstofflimitierung) zur Produktion von 0,38 g/l mit einer Ausbeute von 0,06 mol/(mol Glucose) (Vuoristo et al., 2015a; Vuoristo et al., 2015b). Die cis-Aconitat-Decarboxylase lag jedoch zum Teil in Form von unlöslichen Einschlusskörpern vor (Vuoristo et al., 2015a). Um die Löslichkeit zu erhöhen erstellten Jeon et al. (2016) eine Bibliothek des *cadA*-Gens mit synonymen Codonvarianten der ersten 10 codierenden Codons. Bei zwei Varianten lag das gebildete Enzym nahezu vollständig (95 %) in der löslichen Fraktion vor. Ein *E. coli* Stamm mit der Variante scvCadA_No8 produzierte mit Glycerin (10 g/l) und Citrat (0,85 g/l) als Kohlenstoffquellen innerhalb von 135 h 7,2 g/l Itaconat (Jeon et al., 2016). Die Itaconatsynthese erfolgte dabei in einer stickstofflimitierten stationären Phase. Eine weitere Erhöhung des Itaconattiters, jedoch in Komplexmedium (für die industrielle Produktion oft zu teuer), wurde durch die systematische Überexpression stoffwechselspezifischer Gene ermöglicht (Chang et al., 2017). Ein Stamm mit deletierter Isocitratdehydrogenase und mit verstärkter Expression der Aconitase und Citratsynthase, sowie heterologer Expression der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum*, ermöglichte die Produktion von 20/22 bzw. 18 g/l Itaconat mit Ausbeuten von 0,48/0,58 bzw. 0,42 mol/mol mit Xylose/Glycerol bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle (Chang et al., 2017). Der soweit höchste Titer mit *E. coli* von 43 g/l wurde in einem Fed-batch-Prozess mit Hefeextrakt (90 g/l) und Glycerin (initial 30 g/l) erzielt (Chang et al., 2017). Einen ähnlichen Titer erzielten Kim et al. (2017) durch Ganzzellbiotransformation von Citrat zu 41,6 g/l Itaconat mit einer Substratverwertung von 64 % und einer Produktivität von 2,19 g/l/h.

Eine andere Studie befasste sich mit der Produktion von Itaconat mit *Corynebacterium glutamicum*. Zunächst optimierten die Autoren die CAD-Aktivität durch Fusion des Proteins mit dem Maltosebinde-Protein (MalE) aus *E. coli* (Otten et al., 2015). Da die Produktion von Itaconat erst zum Ende der exponentiellen Phase startete, schränkten sie das Biomassewachstum durch eine Verringerung der Stickstoffkonzentration ein und steigerten so den Titer deutlich von 0,47 g/l auf 3,84 g/l. Im finalen Schritt konstruierten sie durch Austausch des nativen ATG-Startcodons gegen TTG einen Stamm mit verringerter Isocitratdehydrogenaseaktivität und verbesserten dadurch die Produktion auf 7,8 g/l mit einer Ausbeute von 0,4 mol/(mol Glucose).

Einen modellbasierten Ansatz zur Verbesserung der Itaconatsynthese mit *Saccharomyces cerevisiae* verfolgten Blazek et al. (2014). Nach Optimierung der *cadA*-Expression verwendeten sie den simpleOptKnock-Algorithmus, um in einem genomskaligen Modell einzelne Knockout-Kandidaten für eine verbesserte Itaconatproduktion zu identifizieren. Nach

jeder Berechnung wurden mehrere Kandidaten ausgewählt und *in vivo* getestet. Nach drei Iterationen produzierte der Knockout-Stamm $\Delta ade3 \Delta bna2 \Delta tes1$ mit 126 mg/l dreimal so viel Itaconat wie der Ausgangsstamm. Kein positiver Effekt konnte durch Überexpression der Citratsynthase, Aconitase oder Pyruvatcarboxylase erzielt werden (Blazeck et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die heterologe Itaconatproduktion aufgrund niedriger Titer und Ausbeuten noch nicht mit der nativen Produktion von *A. terreus* konkurrieren kann.

2.2. Stammkonstruktion

2.2.1. Deletion von Genen aus dem Chromosom von *E. coli*

Die Entfernung von Genen aus dem Genom von *E. coli* erfolgt standardmäßig durch homologe Rekombination. Hierfür wird über ein Helferplasmid (z.B. pKD46) die Rekombinationsmaschinerie des Bakteriophagen λ exprimiert (Datsenko and Wanner, 2000). Diese besteht aus den drei Proteinen Beta, Exo und Gam (Abbildung 4). Gam verhindert den Abbau linearer dsDNA (Doppelstrang-DNA) durch *E. coli* RecBCD Exonukleasen (Datsenko and Wanner, 2000). Exo baut dsDNA vom 5'-Ende ausgehend ab und bildet ssDNA und Beta bindet an die so entstandene ssDNA und vermittelt die Anlagerung an die homologen Sequenzen im Genom (Mosberg et al., 2010).

Die markerlose Entfernung eines Gens nach (Datsenko and Wanner, 2000) umfasst 5 Schritte (Abbildung 4):

1. Eine Antibiotikakassette, flankiert durch FRT-Sequenzen, wird mit zwei Primern mit 50 bp-Überhängen durch PCR amplifiziert. Die Überhänge sind homolog zum *E. coli*-Genom und flankieren das zu deletierende Gen.
2. Expression der λ Red Proteine Gam, Bet und Exo und Herstellung elektrokompenter Zellen.
3. Das lineare PCR-Produkt wird in die elektrokompenten Zellen elektroporiert. In einigen Zellen wird durch homologe Rekombination das Zielgen gegen die Antibiotikakassette ausgetauscht.
4. Selektion auf Antibiotikaresistenz und Entfernung des temperatursensitiven Helferplasmides durch Wachstum bei 37 °C. Die erfolgreiche Deletion wird anschließend durch Kolonie-PCR verifiziert.
5. Optional kann am Ende die Antibiotikaresistenz wieder durch FLP-Rekombinase-vermittelte Rekombination der FRT-Sequenzen entfernt werden. Die FLP-Rekombinase wird über das Plasmid pCP20 exprimiert.

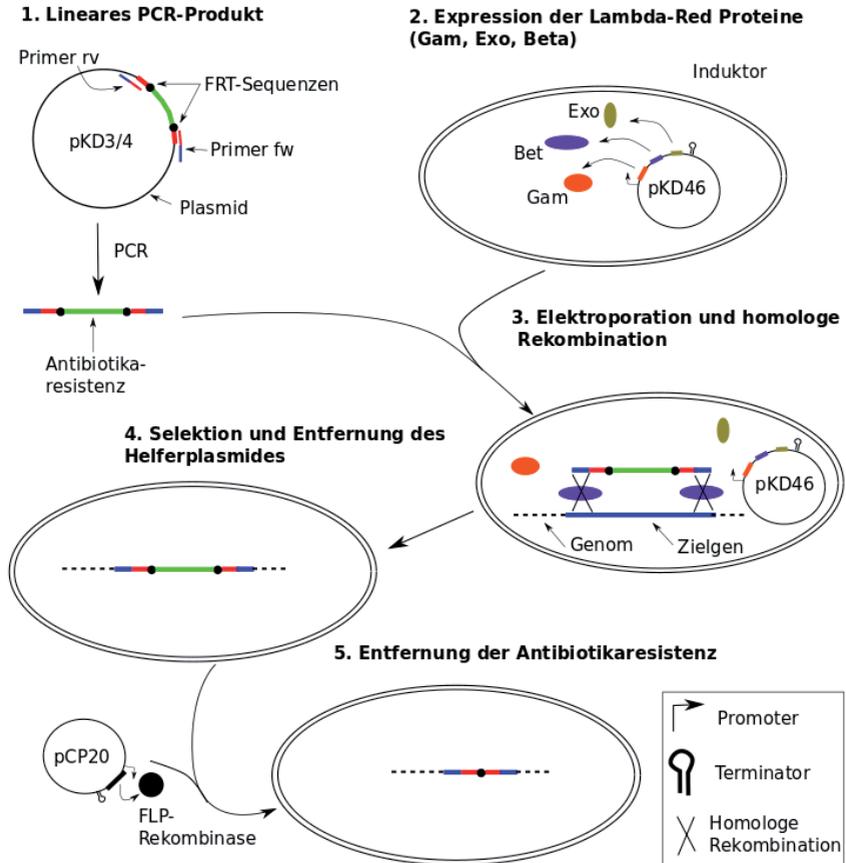


Abbildung 4: Homologe Rekombination nach (Datsenko and Wanner, 2000).

Durch ein optimiertes System mit Integration der Lambda Red Gene und der FLP-Rekombinase in das Genom von *E. coli*, ist es möglich mit dieser Methode bis zu sieben Gene in einer Woche zu deletieren (Jensen et al., 2015). Eine Alternative zu der Selektion über Antibiotikaresistenzen stellt das CRISPR-Cas9 System dar. Das System besteht aus der Cas9-Endonuklease, welche an definierter Stelle einen Doppelstrangbruch generiert, der ohne anschließende Reparatur letal ist (Jiang et al., 2013). Die Zielsequenz, also das zu deletierende Gen, wird über eine guide RNA (sgRNA) definiert. Diese besitzt am 5'-Ende eine 20 bp-Sequenz homolog zum Zielgen und am 3'-Ende eine Duplex-RNA-Struktur zur Bindung an Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014). Zur Bindung von Cas9 an das Genom, muss der Zielsequenz zudem eine PAM-Sequenz (Protospacer adjacent motif) folgen (Doudna and Charpentier, 2014). Wird nun das Zielgen durch homologe Rekombination entfernt, so verschwindet auch die Zielsequenz für Cas9 und

die Zellen überleben die Selektion (Jiang et al., 2013). Die CRISPR-Methode wurde für *E. coli* optimiert und ermöglicht die markerlose Deletion eines Gens innerhalb von 3 Tagen (Zhao et al., 2016).

Für die iterative Konstruktion von Knockout-Stämmen kann auch die P1-Transduktion verwendet werden. Hierbei wird die genetische Veränderung von einer Einzelmutante auf den Zielstamm übertragen. Die Übertragung erfolgt mit dem Bakteriophagen P1, welcher bei der Infektion der Mutante zufällig statt dem eigenen Genom auch Teile des Wirtsgenoms verpackt (Thomason et al., 2007). Phagen, welche die genetische Veränderung tragen, können den DNA-Abschnitt auf den Zielstamm übertragen, welcher diese dann durch Rekombination ins Genom integriert.

2.2.2. Methoden zur dynamischen Regulierung von Stoffwechselwegen

Die Deletion von Genen führt meist zur kompletten Inaktivierung des betreffenden Stoffwechselweges. Ist dieser essentiell für den Organismus, so führt dieses zur Auxotrophie, also zur Abhängigkeit von Medienzusätzen, welche das Fehlen des Stoffwechselweges komplementieren und somit Wachstum ermöglichen. In einem solchen Falle ist es vorteilhaft die Aktivität des Stoffwechselweges ohne vollständige Inaktivierung zu verringern. Üblicherweise erfolgt eine Abschwächung auf der Ebene der Transkription durch Austausch des Promotors (gegen einen schwächeren konstitutiven Promotor), oder auf Ebene der Translation, durch eine modifizierte Ribosomenbindestelle oder durch Austausch des Startcodons. Neben diesen dauerhaften (statischen) Eingriffen in den Metabolismus, besteht auch die Möglichkeit Stoffwechselwege dynamisch zum gewünschten Zeitpunkt ein- oder auszuschalten. Die Regulation kann dabei auf der Ebene der Transkription, Translation oder Posttranslation (Abbildung 5) erfolgen. Im Folgenden werden einige Methoden für eine dynamische Regulation erläutert (siehe auch (Venayak et al., 2015)).

Regulation: Aus-An

Die positive Regulation, also die Induktion der Expression zu einem gewünschten Zeitpunkt, wird häufig für die Produktion von heterologen Proteinen eingesetzt. Die Aktivierung erfolgt klassischerweise durch die Verwendung eines Repressor-Promotor-Paares (Abbildung 5). Der Repressor, welcher konstitutiv exprimiert wird, wird durch die Bindung eines Induktors inaktiviert und blockiert somit nicht weiter die Expression des Gens. Bei dem Induktor kann es sich wie beim Lac-Operon um ein Stoffwechselprodukt oder um künstliche Induktoren wie IPTG handeln. Weiterhin gibt es die temperatursensitiven Repressoren cI857 und LacIs welche eine Aktivierung des Stoffwechselweges durch Erhöhung der Temperatur ermöglichen (Bukrinsky et al., 1988; Lieb, 1966). Darüber hinaus kann die Expression vom Promotor auch direkt über einen Aktivator oder durch einen externen Stimulus (z.B. Quorum sensing, Nährstofflimitierung) hervorgerufen werden (Kasahara et al., 1991; Taga and Bassler, 2003).

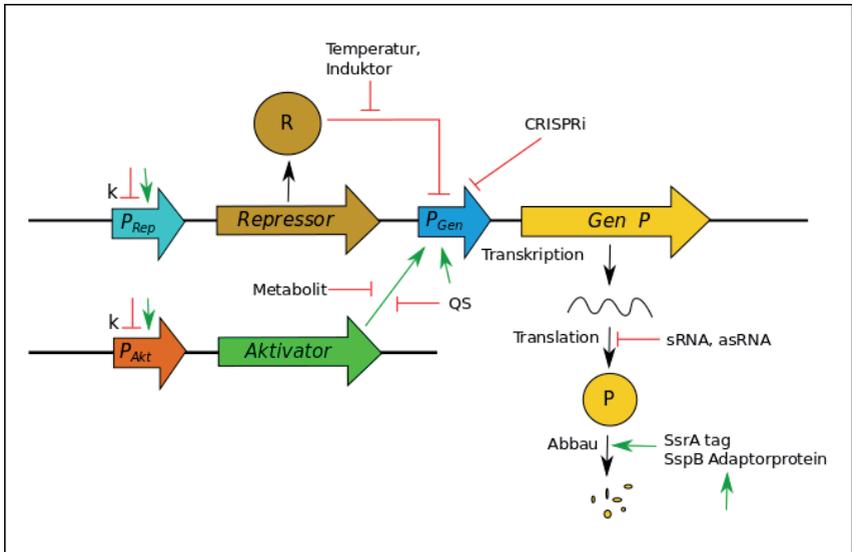


Abbildung 5: Ansatzpunkte und Methoden zur Kontrolle der Bildung und des Abbaus des Proteins P. Grüne schmale Pfeile deuten eine Aktivierung an, rote schmale Pfeile eine Inhibierung. P_X = Promotor, QS = Quorum Sensing, k = konstitutive Expression, asRNA = antisense RNA, sRNA = kleine regulatorische RNA.

Regulation: An-Aus

Eine negative Regulation, also die Inaktivierung eines Biosyntheseweges, stellt eine Alternative zur Gendeletion dar. Die Regulation kann hier sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf der Ebene der Translation oder Posttranslation erfolgen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Gene auf transkriptioneller Ebene zu inaktivieren. Soma und Kollegen verwendeten einen „Kippschalter“, der gleichzeitig einen konkurrierenden Weg ausschaltete und die Synthese des Produktionsweges aktivierte (Soma et al., 2014). Dies wurde durch Verwendung zweier Repressor-Promotor-Paare möglich ($lacI$ - $P_{L-lacO1}$ und $tetR$ - P_{LtetO1}), auch Inverter genannt. Durch die induzierte Synthese von $tetR$ über $P_{L-lacO1}$ wird die Transkription vom Promotor P_{LtetO1} inhibiert (Soma et al., 2014). Gleichzeitig können Stoffwechselwege über $P_{L-lacO1}$ exprimiert werden. Eine Inaktivierung der Expression kann aber auch über die bereits erwähnten temperatursensitiven Regulatoren erfolgen, welche bei niedrigen Temperaturen aktiv sind. So verwendeten (Cho et al., 2012) die Promotoren p_R und p_L vom Bakteriophagen λ , um die Glykolyse durch ein Absenken der Temperatur zu unterbrechen. Einen Ansatz zur autoregulierten Absenkung des Expressionslevels verfolgte Gupta (Gupta et al., 2017). Durch Akkumulation eines Quorum Sensing Signals (AHL (2-Oxohexanoylhomoserinlacton)) kam es in Abhängigkeit von der Zelldichte zur Inaktivierung des Aktivators $EsaR170V$ und somit zur Repression des P_{EsaS} -Promotors (Gupta et al., 2017).

Eine neue Möglichkeit der Regulation ergibt sich durch die Etablierung der CRISPR-Cas-Technologie. Eine inaktive Cas9-Nuclease (dCas9), welche an die Zielsequenz bindet, aber nicht die DNA schneidet, kann die Funktion des Repressors übernehmen (Qi et al., 2013). Durch induzierte Expression der sgRNA, welche die Zielsequenz für die Nuclease vorgibt, wird die Bindung der dCas9 an die homologe Genomsequenz initiiert.

Die nächste Ebene der Regulation ist die der Translation der messenger RNA (mRNA) in die Proteinsequenz. Eine Methode zur Unterbrechung der Translation stellt die Expression von antisense RNA (asRNA) dar (Nakashima and Tamura, 2013). Alternativ können kleine synthetische regulatorische RNAs (sRNAs) verwendet werden. Na und Kollegen entwickelten einen Ansatz zum rationellen Design von sRNAs und nutzten diesen um Targets für die Verbesserung der Tyrosin- und Cadaverinproduktion in *E. coli* zu identifizieren (Na et al., 2013).

Alternativ kann auch eine Inaktivierung des Enzyms durch gesteuerten Proteinabbau erfolgen. Wird das Protein mit einem Abbautag versehen, so wird es durch die Protease erkannt und wird somit kontinuierlich abgebaut. Um diesen Abbau zu steuern, konstruierten (McGinness et al., 2006) Varianten des *ssrA*-Tags, mit abgeschwächter Bindung an die Protease. Eine effiziente Proteolyse erfolgt mit diesen Tags nur dann, wenn gleichzeitig ein Adaptorprotein (*SspB*) exprimiert wird. Die Expression des Adaptorproteins kann mit einem der oben vorgestellten Schalter (aus-ein) erfolgen. Eine Beeinflussung der Enzymaktivität ist aber auch über die Steuerung der Temperatur möglich. So erstellten (Cho et al., 2012) eine Mutante der Glycerinaldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase mit verringerter Aktivität bei 30 °C und optimierten so den switch der Glykolyse basierend auf der temperaturabhängigen Expression von *gapA*.

2.2.3. Adaptive Evolution

Erste Experimente zur adaptiven Evolution wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts durchgeführt. Dallinger inkubierte einen einzelligen Organismus über 7 Jahre unter stetiger Zunahme der Kultivierungstemperatur von 60 °F auf 158 °F und erhöhte somit die Temperaturreistenz (Haas, 2000). Heutzutage ermöglichen neue Technologien wie *Next Generation Sequencing* (NGS) tiefere Einblicke hinsichtlich der Veränderungen, die für eine verbesserte Fitness verantwortlich sind (Dragosits and Mattanovich, 2013). Hieraus können sich neue Ansätze für die gezielte Optimierung von Produktionsstämmen ergeben. Wichtige Parameter für biotechnologische Prozesse, welche durch adaptive Evolution verbessert werden können, sind die maximale Wachstumsrate, die Substratverwertung und die Resistenz gegenüber inhibierenden Substanzen (Dragosits and Mattanovich, 2013).

Aufgrund der geringeren Kosten erfolgt die Adaption meist durch serielle Verdünnung von Batch-Kulturen im Schüttelkolben oder der Mikrotiterplatte. Für eine bessere Kontrolle der

Umweltbedingungen (Temperatur, pH, Gelöstsauerstoff (DO)) und eine konstante Zelldichte bietet sich die Kultivierung im Chemostat an (Dragosits and Mattanovich, 2013). Das zu erwartende optimale Wachstumsverhalten kann zuvor über stöchiometrische Stoffwechselmodelle bestimmt werden. So zeigten Ibarra et al. (2002), dass *E. coli* innerhalb von 40 Tagen von einem Phänotyp mit suboptimalen Wachstum auf Glycerin zu dem durch das Modell vorgegebenen optimalen Phänotyp evolvierte, welcher auch bei weiterer Adaption erhalten blieb. Da auf optimales Wachstum selektioniert wird, kann es jedoch vorkommen, dass während der Adaption gewünschte Eigenschaften wie eine hohe Produktausbeute verloren gehen. Dies kann verhindert werden, indem zunächst die Produktsynthese an das Wachstum gekoppelt wird (siehe 2.3.2). Eine Kopplung ist theoretisch für nahezu alle Metabolite möglich (von Kamp and Klamt, 2017). Für eine begrenzte Anzahl an Metaboliten wurden auch Biosensoren entwickelt, welche eine online-Messung der Produktbildung ermöglichen, und somit für ein Hochdurchsatzscreening eingesetzt werden können (Mahr and Frunzke, 2016).

2.3. Modellbasiertes Metabolic Engineering

Metabolic Engineering ist die gezielte Optimierung von zellulären Aktivitäten durch die Manipulation von enzymatischen, Transport, und regulatorischen Funktionen der Zelle mit Hilfe der rekombinanten DNA Technologie (Bailey, 1991). Die Konstruktion eines Produktionsstammes erfolgt dabei durch die iterative Anwendung von Methoden zur Identifikation von geeigneten Interventionen (Design), deren Implementierung und anschließender Analyse der daraus folgenden Auswirkungen auf das Wachstum und die Produktion des genetisch veränderten Organismus. Die molekularbiologischen Methoden zur gezielten Veränderung des Stoffwechsels wurden bereits in Kapitel 2.2 vorgestellt. Im Folgenden werden theoretische Methoden beschrieben, welche im Metabolic Engineering Zyklus für die Analyse von Kultivierungsdaten und für die Vorhersage von geeigneten Interventionen (Stammdesign) eingesetzt werden können.

2.3.1. Stöchiometrische Netzwerkanalyse

Stöchiometrische Netzwerke beschreiben die strukturellen Eigenschaften des Metabolismus und benötigen somit keinerlei kinetische Informationen, welche oft nur begrenzt verfügbar und mit hohen Unsicherheiten versehen sind (Klamt et al., 2014). Die Topologie des Stoffwechselnetzes kann mit der stöchiometrischen Matrix \mathbf{N} beschrieben werden. Dabei handelt es sich um eine $m \times q$ Matrix, wobei m die Anzahl der internen Metabolite und q die Anzahl der Reaktionen beschreibt. Für das Netzwerkbeispiel in Abbildung 6 ergibt sich somit eine 10×13 Matrix (10 interne Metabolite, 13 Reaktionen). Externe Metabolite werden für die Bilanzierung meist nicht explizit berücksichtigt, da es sich dabei um Quellen (Substrate) oder Senken (Produkte) handelt.

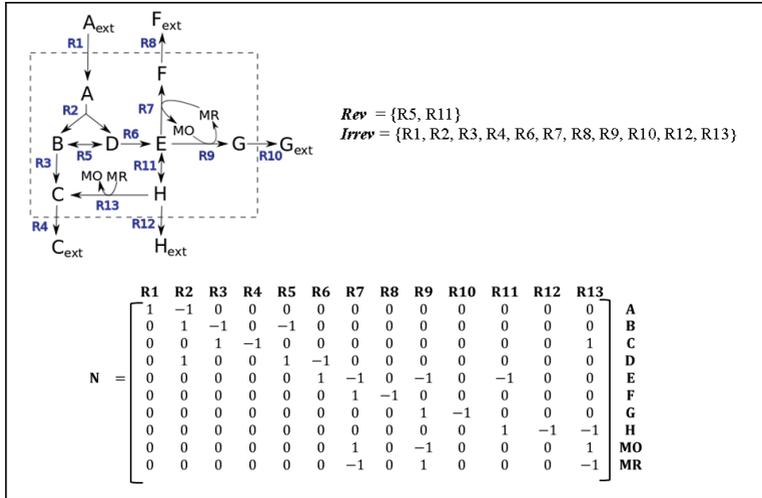


Abbildung 6: Netzwerkbeispiel mit zugehöriger stöchiometrischen Matrix N . Neben dem Ratenvektor \mathbf{r} ist auch die Reversibilität der Reaktionen definiert. Rev und $Irrev$ beschreiben die Menge der reversiblen bzw. irreversiblen Reaktionen.

Die Reaktionen in einem Stoffwechselnetzwerk werden durch ihre Stöchiometrie, also durch das Verhältnis der beteiligten Metabolite, welche ineinander umgewandelt werden, durch die Reaktionsrichtung (reversibel oder irreversibel) und durch ihre Kinetik charakterisiert. Fast alle biochemischen Reaktionen in einer Zelle werden durch Enzyme katalysiert, die durch die Transkription und Translation der entsprechenden Gene synthetisiert werden. Daher können sequenzierte Genome als Basis für die Rekonstruktion metabolischer Netzwerke dienen. Durch geeignete Softwaretools erfolgt dabei zunächst eine automatische Erstellung eines Netzwerkentwurfes unter Berücksichtigung vorhandener biologischer Daten aus Stoffwechseldatenbanken wie KEGG oder BRENDA (Kim et al., 2015). Eine anschließende manuelle Überprüfung und Anpassung des Modells ist jedoch erforderlich, da organismenspezifische Eigenschaften wie die Cofaktorspezifität berücksichtigt, Lücken gefüllt, und gegebenenfalls Fehler korrigiert werden müssen (Feist et al., 2009). Im finalen Schritt wird das rekonstruierte Netzwerk in eine mathematische Form gebracht (inklusive stöchiometrischer Matrix) und kann dann für Modellierungszwecke verwendet werden.

Da vor allem im Zentralstoffwechsel eine schnelle Umsetzung der Metabolite erfolgt, wird angenommen, dass sich deren Konzentration ($\mathbf{c}(t)$) über einen längeren Zeitraum nicht ändert und der Stoffwechsel daher im Fließgleichgewicht operiert (Gleichung 2.3.1).

$$\frac{d\mathbf{c}(t)}{dt} = \mathbf{N}\mathbf{r}(t) = \mathbf{0} \quad (\text{Gleichung 2.3.1})$$

Werden die Reaktionsraten ($\mathbf{r}(t)$) als unabhängige Variablen angesehen, so vereinfacht sich die Gleichung (2.3.1.) zu einem homogenen linearen Gleichungssystem:

$$\mathbf{N}\mathbf{r} = \mathbf{0} \quad (\text{Gleichung 2.3.2})$$

Dieses besagt, dass sich die Produktion und der Verbrauch von jedem internen Metaboliten die Waage halten muss. Die Lösungen für \mathbf{r} in Gleichung 2.3.2 werden als *stationäre Flussverteilungen* (SFV) bezeichnet. Diese befinden sich im rechten Nullraum (Kern, \mathbf{K}) der Matrix \mathbf{N} (Klamt et al., 2014).

Beim *constraint-based modelling* (CBM) werden zusätzliche Nebenbedingungen berücksichtigt, um den Lösungsraum weiter einzuschränken (Price et al., 2003). Dazu gehören Reversibilitätsbedingungen (NB2) oder es können die möglichen Raten einer Reaktion durch Setzen von oberen und unteren Flussgrenzen (NB3) oder durch Verwendung von Messdaten (NB4) eingeschränkt werden.

(NB1)	$\mathbf{N}\mathbf{r} = \mathbf{0}$	(Fließgleichgewicht)
(NB2)	$r_i \geq 0 \quad \forall i \in \text{Irrev}$	(Reversibilität)
(NB3)	$\alpha_i \leq r_i \leq \beta_i$	(Kapazität)
(NB4)	$r_i = m_i$	(Messdaten)

Flussgrenzen (NB3), die nicht bekannt sind, können durch die Verwendung von großen Zahlen oder „unendlich“ („ ∞ “) als (quasi) unbegrenzt definiert werden. Die Reversibilitätsbedingung (NB2) und Messinformationen können alternativ auch direkt in NB3 integriert werden. So kann die untere Grenze von irreversiblen Reaktionen mit $\alpha_i = 0$ ausgedrückt werden.

Bei der **Flussbilanzanalyse (FBA)** wird zusätzlich eine lineare Zielfunktion maximiert (Orth et al., 2010):

$$\mathbf{c}^T\mathbf{r} = c_1r_1 + \dots c_a r_a = \max! \quad (\text{Gleichung 2.3.3})$$

Übliche Zielfunktionen beinhalten die Maximierung der Biomassessynthese, der ATP-Synthese oder der Produktsynthese (Price et al., 2003). So kann FBA verwendet werden, um (1) optimales Wachstum der Zellen vorherzusagen, (2) um die Auswirkungen von z.B. Genknockouts auf das Wachstum zu untersuchen, (3) essentielle (kein Wachstum) oder blockierte ($r_i = 0$) Reaktionen zu identifizieren, oder (4) das Potential eines Mikroorganismus für die Produktion eines bestimmten Metaboliten zu bestimmen (z.B. mögliche Ausbeuten). Auch kann über (NB4) geprüft werden, ob experimentell gemessenen Raten konsistent mit dem Modell sind. Da meist jedoch mehr als eine optimale Lösung existiert, können auf Grundlage von FBA wenig Aussagen über die intrazellulären Flussverteilungen getroffen werden (Mahadevan and Schilling, 2003). Um die Variabilität der Flussraten für eine optimale Lösung zu bestimmen kann die **Flussvariabilitätsanalyse (FVA)** verwendet werden (Mahadevan and

Schilling, 2003). Hierzu werden für gegebene Nebenbedingungen die obere und untere Grenze aller Reaktionen nacheinander durch Optimierung ermittelt. Liegt der Ratenbereich einer Reaktion komplett im positiven (> 0) oder komplett im negativen (< 0) Bereich, so ist diese Reaktion an allen möglichen Flussverteilungen beteiligt und somit essentiell für das betrachtete Szenario.

Eine Beschreibung des Lösungsraums, der durch das Fließgleichgewicht (NB1) und die Reversibilitätsbedingungen (NB2) gegeben ist, kann über die **Elementarmodenanalyse** erfolgen. **Elementarmoden (EM)** stellen minimale funktionale Einheiten des Netzwerkes dar (Schuster and Hilgetag, 1994). Für sie gilt:

(EMB1) $\mathbf{N} \mathbf{e} = \mathbf{0}$ (Fließgleichgewicht)

(EMB2) $e_i \geq 0 \ (\forall i \in \text{Irrev})$ (Reversibilität)

(EMB3) Es existiert kein nichttrivialer Ratenvektor \mathbf{r} , der im Fließgleichgewicht operiert und EMB2 erfüllt und gleichzeitig eine Teilmenge von \mathbf{e} darstellt ($\text{supp}(\mathbf{r}) \subset \text{supp}(\mathbf{e})$) (Unzerlegbarkeit)

Der Support *supp* ist definiert als die Menge der Nicht-Null Elemente eines Vektors \mathbf{r} ($\text{supp}(\mathbf{r}) = \{i: r_i \neq 0\}$). Die Bedingung EMB3 besagt, dass eine Entfernung einer in \mathbf{e} enthaltenen Reaktion zur Inaktivierung des entsprechenden EM führt. Geometrisch betrachtet spannen die Elementarmoden einen konvexen polyedrischen Kegel auf, welcher alle möglichen SFV enthält, die im Fließgleichgewicht operieren (NB1/EMB1) und die Reversibilitätsbedingung (NB2/EMB2) erfüllen (Klamt et al., 2014). Jede dieser SFV kann somit als Linearkombination der Elementarmoden dargestellt werden. Die 7 Elementarmoden für das Beispielnetzwerk (Abbildung 6) sind in Abbildung 7 dargestellt. Diese können verwendet werden um funktionale Einheiten des Netzwerkes zu charakterisieren, optimale Ausbeuten zu bestimmen, essentielle Reaktionen zu identifizieren, und Aussagen über die Flexibilität des Netzwerkes zu treffen (Klamt et al., 2014). Beispielsweise kann C im Beispielnetzwerk mit einer maximalen Ausbeute von 2 (Cext/Aext) produziert werden. Da nur ein Elementarmodus mit maximaler Produktion existiert (EM6), sind somit alle enthaltenen Reaktionen in EM6 für die optimale Ausbeute essentiell. Eine höhere Flexibilität ist für die Produktion von G gegeben. Diese ist an die Produktion von C oder F gekoppelt und kann über 4 verschiedene minimale Wege (EM2-EM5) mit zwei verschiedenen Ausbeuten realisiert werden (Abbildung 7). Essentielle Reaktionen, die in all diesen vier EM enthalten sind, sind R1, R2, R6, R9 und R10.

Eine Erweiterung fand das Konzept der Elementarmoden durch die Einführung von sogenannten **Elementaren Flussvektoren (EFV)** (Klamt et al., 2017b; Urbanczik, 2007). Diese ermöglichen auch die Berücksichtigung der inhomogenen Nebenbedingungen wie minimale und maximale Reaktionsraten (NB3) oder Messungen (NB4) und erlauben dann eine ähnliche umfassende Beschreibung des resultierenden Lösungsraums der Flussverteilungen wie bei den EM.

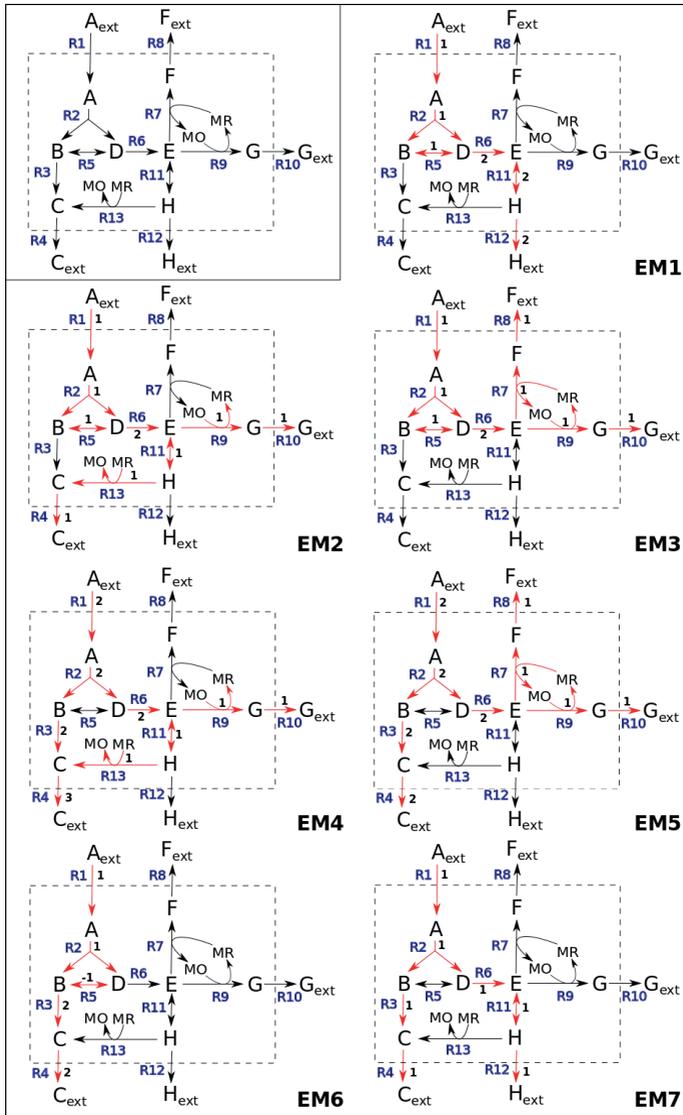


Abbildung 7: Elementarmoden des Beispielnetzwerkes aus Abbildung 6.

2.3.2. Verwendung stöchiometrischer Modelle zur Identifizierung von Stammdesign-Strategien basierend auf Gendelektionen

Eine Möglichkeit, einen Mikroorganismus für die Produktion eines gewählten Metaboliten zu optimieren, besteht in der Kopplung von Wachstum und Produktsynthese. Ein Stamm mit einer obligatorischen Wachstumskopplung muss das Produkt immer bilden um wachsen zu können. Der Vorteil einer solchen strikten Kopplung besteht darin, dass der Stamm auch bei verändertem Phänotyp (beispielsweise durch Adaption) das gewünschte Produkt bilden muss. Zudem können solche Stämme durch Adaption weiter bzgl. Wachstum und Produktsynthese optimiert werden.

Nährstoffe werden von der Zelle zunächst über katabolische Reaktionen zu einer kleinen Anzahl an Vorstufen (Precursor) und in Energie (ATP) und Reduktionsäquivalente (NAD(P)H) umgewandelt. Diese dienen dann als Grundbausteine für die Synthese von komplexen Biomolekülen (Fettsäuren, Proteine, RNA, DNA), welche für die Bildung von Biomasse, also neuen funktionalen Zellen, benötigt werden. Die Menge an Nebenprodukten wird bei Maximierung der Biomasse normalerweise minimiert. Allerdings besteht eine natürliche wachstumsgekoppelte Produktion beispielsweise unter anaeroben Bedingungen, wo die Bildung eines oder mehrerer Gärprodukte (z.B. Ethanol, Laktat, Succinat) für die Aufrechterhaltung der Redoxbilanz essentiell ist (Forster and Gescher, 2014). Für andere industriell relevante Produkte muss eine solche Kopplung jedoch erst etabliert werden. Die Stoffwechselwege in der Zelle müssen dafür mit Hilfe geeigneter Interventionen so umgeleitet werden, dass zwar immer noch eine ausreichende Menge an Vorstufen für die Biomassensynthese bereitgestellt wird, aber gleichzeitig auch ein Großteil des Substrates für die Produktion verwendet wird (Abbildung 8A). Mögliche Interventionen sind eine verstärkte oder abgeschwächte Aktivität bestimmter Stoffwechselwege oder die Deletion von Genen zur kompletten Inaktivierung dieser Wege. Für die Vorhersage von Deletionstargets zur Kopplung von Biomasse- und Produktsynthese auf Basis von Stoffwechselnetzen wurden verschiedene Methoden entwickelt (Abbildung 8B), welche im Folgenden erläutert werden. Das Interventionsziel kann dabei über sogenannte Trade-off-Plots von Wachstum vs. Produktion definiert werden. Je nach Anwendung und Methode werden dabei entweder die Ausbeuten oder Raten oder Kombinationen von beidem (für Biomasse- bzw. Produktsynthese) betrachtet (siehe Abbildung 8B).

Ein erster Algorithmus zur Berechnung von Deletionstargets, basierend auf FBA, wurde durch Burgard et al. (2003) mit dem OptKnock-Algorithmus entwickelt. Dabei handelt es sich um eine Bilevel-Optimierung, welche über die innere Zielfunktion das Wachstum, und über die äußere Zielfunktion durch Hinzufügen von Reaktionsdeletionen die Produktbildung optimiert. Die Reaktionsdeletionen werden dann später in Genknockouts (KOs) übersetzt. Die Optimierung erfolgt unter Berücksichtigung einer maximalen Substrataufnahmerate und einer gegebenen minimalen Wachstumsrate. Durch die gezielte Entfernung von bestimmten Reaktionen wird gewährleistet, dass bei optimalem Wachstum auch eine Produktsynthese

stattfinden kann. In Abbildung 8B ist beispielhaft ein Trade-off-Plot für Produkt- vs. Biomassesynthese für den Wildtyp und eine mögliche OptKnock-Lösung gezeigt (hier im Trade-off-Plot mit Raten an den Achsen). Durch die Interventionen existiert bei optimalem Wachstum nach Implementierung der von OptKnock ermittelten KO somit mindestens eine Lösung mit optimaler Produktion (Zielstamm, grüner Punkt). Der OptKnock-Algorithmus wurde erfolgreich zur Verbesserung der Laktat- (Fong et al., 2005) und 1,4-Butandiolproduktion (Yim et al., 2011) mit *E. coli* eingesetzt.

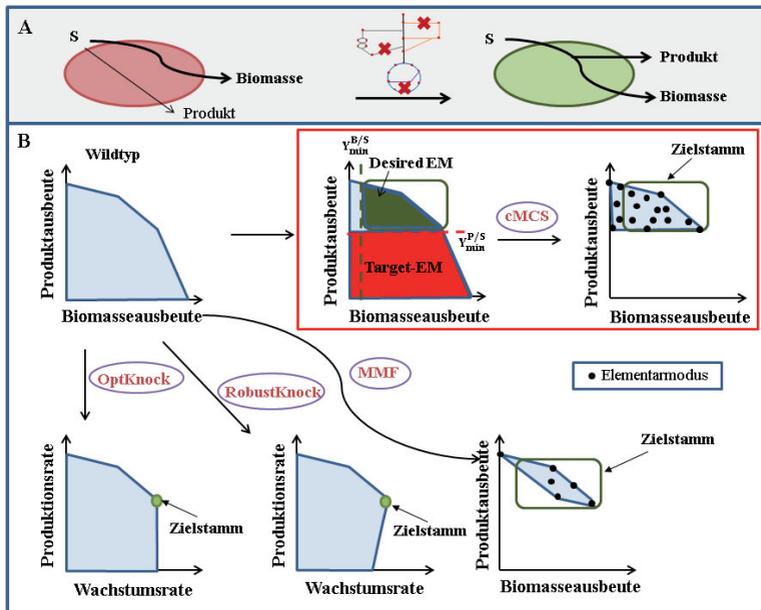


Abbildung 8: Metabolic Engineering Strategien basierend auf Gendelektionen zur Kopplung von Produkt- und Biomassesynthese. A) Der Wildtyp (rot) produziert vorwiegend Biomasse und nur geringe Mengen Produkt (oder kein Produkt). Durch geeignete Knockouts (KO) im Stoffwechsel entsteht ein Stamm (grün), bei dem die Produktbildung an die Biomasseproduktion gekoppelt ist. B) Methoden zur Vorhersage von KO-Strategien. Charakteristische Lösungen für die Produkt- und Biomasseausbeuten der resultierenden Stämme sind skizziert (Meist existieren mehrere Lösungen). Da MMF (Minimal Metabolic Functionality) und cMCS (constrained Minimal Cut Set) auf Elementarmodulen basieren, sind die verbliebenen EM durch Punkte gekennzeichnet.

Es kann bei OptKnock-Lösungen jedoch vorkommen, dass die Kopplung durch alternative Produkte zerstört wird. Wie die senkrechte Linie im Trade-off-Plot der OptKnock-Lösung in Abbildung 8B zeigt, existieren bei maximaler Wachstumsrate möglicherweise auch Lösungen mit geringer oder auch keiner Synthese vom gewünschten Produkt. Ein anschauliches Beispiel liefert das Beispielnetzwerk (Abbildung 6 und 7). Die Synthese von G ist hier zwar an die Synthese von C gekoppelt, jedoch existiert auch eine Kopplung mit F. Da über FBA nur einzelne optimale Lösungen berechnet werden, werden solche konkurrierenden Produktionswege bei OptKnock nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde der

RobustKnock-Algorithmus entworfen (Tepper and Shlomi, 2010). Dieser maximiert durch die KOs die minimale Produktsyntheserate unter maximaler Biomasseproduktion. Der Stamm muss somit unausweichlich Produkt bilden um mit maximaler Wachstumsrate zu wachsen (Abbildung 8B). Weicht die reale Wachstumsrate aber von der durch das Modell bestimmten maximalen Wachstumsrate ab, so können weiterhin Lösungen ohne Produktbildung existieren.

Einen EM-basierten Ansatz zur Konstruktion einer Zelle mit **minimaler metabolischer Funktionalität (MMF)** verfolgten Trinh und Kollegen (Trinh et al., 2006). Hierfür reduzierten sie schrittweise die Gesamtzahl der EM bis nur noch wenige mit den gewünschten Eigenschaften übrig blieben. Für die Konstruktion eines Ethanol-Produktionsstammes reduzierte sich die Anzahl der EM beispielsweise von 5010 auf 12 (Trinh et al., 2008). Für die Selektion geeigneter Knockouts sind folgende Schritte nötig:

- 1) Untersuchung des Effektes einzelner KOs auf die Anzahl der verbleibenden EM. Sortierung mit zunehmender Anzahl der verbleibenden EM.
- 2) Berechnung der maximalen Produkt- und Biomasseausbeuten für die (durch den KO) reduzierte metabolische Kapazität.
- 3) Auswahl der Reaktion mit geringster Anzahl verbleibender EM und maximaler Produkt- und Biomasseproduktion.

Die Anwendung des Ansatzes führte beispielsweise zu minimalen *E. coli*-Stämmen mit effizienter Biomasse- (Trinh et al., 2006) bzw. Ethanolproduktion (Trinh et al., 2008).

Ein weiterer EM-basierter Ansatz ist der der **Minimal Cut Sets (MCSs)** (Klamt and Gilles, 2004). Ein MCS ist eine (support-)minimale Menge an Reaktionen, deren Inaktivierung zum Verlust einer bestimmten/unerwünschten Netzwerkfunktion führt. Für die Berechnung der MCSs werden alle Elementarmoden mit der unerwünschten Netzwerkfunktion als **Target-Moden (T)** definiert, die durch geeignete Deletionen von Reaktionen inaktiviert werden müssen. Die MCSs können dann als „*minimal hitting sets*“ der Targetmoden über den Berge-Algorithmus berechnet werden (Hädicke and Klamt, 2011). Wird für das Beispielnetzwerk aus Abbildung 6 die Produktion von C (aus Substrat A) mit einer minimalen Ausbeute von 0,5 gefordert, so besteht **T** aus EM1 und EM3, da diese nur zur Produktion von H, G oder F beitragen. Die Berechnung erfolgt dann iterativ startend bei EM1. Die im ersten Schritt bestimmten vorübergehenden MCSs enthalten aufgrund des Minimalitätskriteriums jeweils nur eine Reaktion aus EM1. Anschließend werden alle Reaktionen aus EM1 mit denen aus EM3 kombiniert und abschließend auf ihre Minimalität getestet. Da R1, R2, R5 und R6 in beiden EM enthalten sind, sind diese bereits MCSs (MCS1-4, Tabelle 2). Die weiteren MCSs bestehen jeweils aus einer Reaktion aus EM1 (R11 oder R13) und aus EM3 (R7, R8, R9, R10). Bei Betrachtung der Elementarmoden, welche die Produktion von C ermöglichen, wird deutlich, dass die Reaktionen R1 und R2 essentiell für die Produktion von C sind. Somit stellen MCS1 und MCS2 keine Lösungen für das Optimierungsproblem dar.

Tabelle 2: Beispiele von Minimal Cut Sets im Beispielnetzwerk. Die Minimal Cut Sets (MCS) in der ersten Zeile sind alle minimalen Interventionen, welche Elementarmoden ohne Produktion von Cext (EM1 und EM3) unterdrücken (Target-Moden). Für die Berechnung von constrained MCS (cMCS) zur Synthese von C (zweite Zeile) wurde zusätzlich gefordert, dass mindestens ein EM mit Produktion von Cext erhalten bleibt. Für die gekoppelte Synthese von Cext und Gext (3. Zeile) wurde gefordert, dass mindestens ein EM mit gekoppelter Produktion von Gext und Cext (EM2, EM4 und EM5) erhalten bleibt (Desired-Moden). Die „x“ in der zweiten und dritten Zeile deuten an, welche der ursprünglichen MCS aus Zeile 1 erhalten bleiben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MCS für Synthese von C	R1	R2	R5	R6	R7 R11	R8 R11	R9 R11	R10 R11	R12 R7	R12 R8	R12 R9	R12 R10
cMCS für Synthese von C			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
cMCS für Kopplung der Synthese von C und G			x (1)						x (2)	x (3)		

Die Berücksichtigung von gewünschten Netzwerkeigenschaften (z.B. Produktion von C) wurde durch die Erweiterung der MCSs zu den **constrained Minimal Cut Sets (cMCS)** möglich (Hädicke and Klamt, 2011). Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 8B dargestellt. Neben den **Targetmoden T** (hier: alle EM mit geringer Produktausbeute) werden zusätzlich **Desired-Moden (D)** ausgewählt. Von den **D** mit dem erwünschten Verhalten (z.B.: hohe Produktausbeute, Mindest-Biomasseausbeute) muss per Definition eine definierte Anzahl n erhalten bleiben. Wird nun die Synthese von C gefordert, so ist die Menge der Desired-Moden folglich $D = \{EM2, EM4, EM5, EM6, \text{ und } EM7\}$. Von den vorherigen MCS sind nun die beiden ersten keine cMCSs (Tabelle 2; zweite Zeile), da durch die Deletion von R1 oder R2 die Synthese von C blockiert wird.

Über den cMCS-Ansatz kann nun wie folgt auch eine wachstumsgekoppelte Produktion generiert werden. Wird z.B. angenommen, dass G im Beispielnetzwerk eine Biomassekomponente und C ein gewünschtes Produkt ist, so kann z.B. für G eine Mindestausbeute von 0,5 und für C eine Ausbeute von 1 gefordert werden. Die Desired-Moden **D**, welche die Kopplung der Produktion von C und G mit den geforderten Ausbeuten ermöglichen, sind $D = \{EM2, EM4, EM5\}$. Die Targetmoden sind wieder dieselben wie in den vorherigen beiden Beispielen: $T = \{EM1, EM3\}$. EM6 und EM7 werden hier also nicht als Targets gesehen, da sie das gewünschte Produkt C produzieren (allerdings kein G). Eine Kopplung wird also nur in Richtung von G erzwungen: wird G synthetisiert, dann muss auch C entstehen. Soll nun mindestens einer der in **D** enthaltenen EM erhalten bleiben, so sind von den 12 zu Beginn bestimmten MCS nur drei cMCSs (Tabelle 2, dritte Zeile). Die resultierenden Ausbeutediagramme dieser drei cMCS sind in Abbildung 9 dargestellt. In diesem Fall erscheinen das zweite und dritte cMCS am geeignetsten, da hier die EM mit der jeweils höchsten Ausbeute von G (EM2) und C (EM6) als auch der EM mit optimaler Kopplung (EM4) erhalten bleiben. Das Netzwerkbeispiel und die cMCS verdeutlichen zudem drei mögliche Kopplungsstrategien:

- 1) **Kopplung über Cofaktor:** In EM2 wird bei der Synthese von G ein Cofaktor MO zu MR umgesetzt. Die Regeneration von MO erfolgt dann durch die Synthese von C.
- 2) **Entfernung konkurrierender Reaktionen und Produkte:** Bei cMCS2 und cMCS3 wird durch die KOs die Synthese der alternativen Produkte H und F unterbunden. Da auch die Synthese von G ohne C nicht möglich ist (siehe Kopplungsstrategie 1), muss C gebildet werden.
- 3) **Flussteilung:** Durch die Deletion von R5 (cMCS1) wird die Aufspaltung des Flusses von A in B und D erzwungen. B kann somit nur noch in C umgewandelt werden.

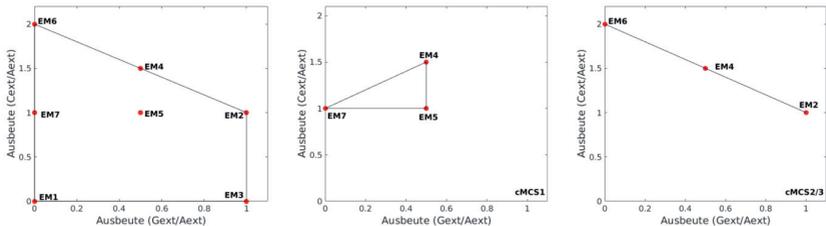


Abbildung 9: Ausbeutediagramm für die Produktion von C und G. Das erste Diagramm (links) zeigt den gesamten Lösungsraum für das Netzwerk, welcher durch die Elementarmoden aufgespannt wird. Die weiteren zwei Trade-off-Diagramme stellen die reduzierten Lösungen dar, welche sich aus den reduzierten Netzen nach Implementation der drei cMCS zur gekoppelten Synthese von G und C ergeben (vgl. Tabelle 2; 3. Zeile). Mitte: resultierender Trade-off-Plot für das erste cMCS; rechts: für das zweite und dritte cMCS aus Zeile 3 in Tabelle 2.

Im Gegensatz zu OptKnock und RobustKnock erzwingen alle cMCSs nach der oben beschriebenen Methode eine starke Kopplung von Produkt- und Biomassesynthese: alle verbliebenen Flussverteilungen \mathbf{r} führen zu einer vorher definierten minimalen Produktion ($Y_{\min}^{P/S}$). Somit wird unabhängig von der erreichten Biomasseausbeute ($Y_{\mathbf{r}}^{B/S}$) immer das gewünschte Produkt gebildet. Für eine starke Kopplung gilt folglich: $Y_{\mathbf{r}}^{P/S} \geq Y_{\min}^{P/S}$ für alle \mathbf{r} und $Y_{\mathbf{r}}^{B/S} \geq Y_{\min}^{B/S}$ für mindestens eine Flussverteilung \mathbf{r} (Klamt and Mahadevan, 2015) nach Deletion der Reaktionen eines cMCS. Eine schwache Kopplung liegt hingegen vor, wenn für $Y_{\mathbf{r}}^{B/S} \geq Y_{\min}^{B/S}$ die minimale Produktausbeute $Y_{\min}^{P/S}$ nicht unterschritten wird. Die in Abbildung 8B gezeigten Lösung für RobustKnock garantiert eine minimale Produktsynthese nur bei maximalem Wachstum ($Y_{\mathbf{r}}^{B/S} = Y_{\max}^{B/S}$) und ist daher ein Spezialfall der schwachen Kopplung. Generell ist eine starke Kopplung dann möglich, wenn mindestens ein EM e^* mit $Y_{e^*}^{P/S} \geq Y_{\min}^{P/S}$ und $Y_{e^*}^{B/S} \geq Y_{\min}^{B/S}$ existiert (Klamt and Mahadevan, 2015). Die Möglichkeit der starken Kopplung für eine Vielzahl von Produkten in verschiedensten Produktionsorganismen belegt, dass die Wachstumskopplung ein potentiell breit anwendbares Prinzip für das Metabolic Engineering darstellt (von Kamp and Klamt, 2017).

Anders als beim MMF-Ansatz können durch die cMCSs alle möglichen Interventionsstrategien berechnet werden, aus denen dann die für die Praxis am geeignetste Strategie ausgewählt werden kann. Darüber hinaus ermöglichen die cMCS die Identifizierung von Reaktionen, welche für ein gegebenes Optimierungsziel zwingend ausgeschaltet werden müssen. Zudem

können cMCSs eine geringere Anzahl an KOs enthalten als eine vergleichbare MMF-Lösung (Hädicke and Klamt, 2011).

Die Berechnung der kleinsten (c)MCSs ist auch in genomskaligen Netzen möglich, deren EM gewöhnlich nicht vollständig berechnet werden können (von Kamp and Klamt, 2014). Hierfür nutzen von Kamp und Klamt das Dualitätsprinzip, welches besagt, dass die EM eines dualen Netzwerkes den Minimal Cut Sets des primären (metabolischen) Netzwerkes entsprechen (Ballerstein et al., 2012). Somit können die Minimal Cut Sets direkt über die Berechnung der kleinsten EM des dualen Netzwerkes bestimmt werden. Außerdem lassen sich im dualen Ansatz inhomogene Nebenbedingungen (wie Flussgrenzen, minimaler ATPmaint...) direkt mit integrieren. Der von von Kamp and Klamt (2014) entwickelte Algorithmus (MCSEnumerator) ermöglicht somit die Berechnung tausender Interventionsstrategien für ein Netzwerkmodell von *E. coli* mit 2382 Reaktionen und 1668 internen Metaboliten. Der Bereich der gewünschten (desired) und unerwünschten (undesired) Flussverteilungen wird hierbei über lineare Ungleichungen definiert:

- unerwünschte SFV: $\mathbf{T} \mathbf{r} \leq \mathbf{t}$
- gewünschte SFV: $\mathbf{D} \mathbf{r} \leq \mathbf{d}$

Für das Beispiel oben zur gekoppelten Synthese von G und C ergibt sich:

$$\mathbf{D} = [Y_{\min}^{G_{\text{ext}}/A_{\text{ext}}} \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ -1 \ 0 \ 0 \ 0], \mathbf{d} = (0), r_{R1} \geq 1$$

$$\mathbf{T} = [-Y_{\min}^{C_{\text{ext}}/A_{\text{ext}}} \ 0 \ 0 \ 1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0], \mathbf{t} = (0), r_{R1} \geq 1$$

Die Angabe $r_{R1} \geq 1$ stellt jeweils sicher, dass die Angaben für SFV mit Flüssen ungleich Null gilt (Nullvektor wird ausgeschlossen).

Als minimal geforderte Ausbeuten wurde hier gesetzt:

$$Y_{\min}^{G_{\text{ext}}/A_{\text{ext}}} = 0,4$$

$$Y_{\min}^{C_{\text{ext}}/A_{\text{ext}}} = 0,5$$

3. Material und Methoden

3.1. Stämme und Stammkonstruktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Erstellung der Knockoutmutanten erfolgte entweder durch Lambda-Red-Rekombination (siehe Abschnitt 2.2.1, Abbildung 4 (Datsenko and Wanner, 2000)) oder durch P1-Transduktion (Thomason et al., 2007).

Für die Lambda-Red-Rekombination wurde zunächst eine Resistenzkassette vom Plasmid pKD3 (Chloramphenicol) oder pKD4 (Kanamycin) mit Hilfe des entsprechenden Primerpaares (Tabelle 4) per Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Für den Austausch des Promotors der Isocitratdehydrogenase wurden die Plasmide pKD3_P2 und pKD3_Ptemp verwendet. Wie beim Knockout wurde hier die zu deletierende Region durch die homologen Enden des PCR-Produktes definiert. Wurde neben dem Promotor auch die natürliche Ribosomenbindestelle ersetzt, so erfolgte die PCR mit den Primern *D_Picd_P2_fw* und *D_Picd_P2_rv*. Sollte nur der Promotor ausgetauscht werden, so wurden die Primer *D_Picd_P2_fw* und *icd_nativeRBS_rv* bzw. *icd_PR_nativeRBS* verwendet. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit DpnI (NEB, Ipswich (US)) verdaut und nach erneuter Reinigung in kompetente *E. coli* (mit 1 mM Arabinose induziertem pKD46) elektroporiert. Nach der Regeneration in SOC-Medium (1h im Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg (DE)) wurde der Ansatz am gleichen oder am folgenden Tag auf LB₀/LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen.

Für Mehrfachmutanten kam auch die P1-Transduktion zum Einsatz, bei der zunächst die Einzelmutante mit dem P1-Phagen infiziert wurde. Mit dem erhaltenen Phagenlysate wurde dann der Zielstamm infiziert um die genetische Veränderung zu übertragen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Thomason (Thomason et al., 2007) mit folgenden Änderungen: Schritt 2 mit 2,5 mM CaCl₂ und Schritt 7 in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 5000 rpm. Die Selektion erfolgte auf LB₀/LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe 3.4).

Antibiotikaresistente Klone wurden unter Verwendung des *Taq* 2x Master Mixes (NEB) auf die erfolgreiche Deletion/Integration hin überprüft.

Für die Stammhaltung wurden die Stämme über Nacht in Komplexmedium angezogen, danach in mit Glycerin verdünnten (50 %) Slant-Medium resuspendiert und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 3: Verwendete Stämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
MG1655	Wildtyp <i>E. coli</i> K12	FRB426 (Blattner lab)
DH5 α	<i>F- thi-1 recA1 relA1 endA1 hsdR17 supE44 gyrA ΔlacU169(ϕ80 ΔlacZΔM15)</i>	(Hanahan, 1983)
BW25141	<i>lacF⁺ rrrB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
BJH30	MG1655 Δ aceA Δ sucCD Δ pykA Δ pykF Δ pta Δ Picd:: <i>cam_P2</i>	Diese Arbeit
BJH30 7.1 K1	Evolvierter Stamm BJH30 aus Adaptionsansatz 1, isoliert nach 6 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
BJH30 7.2 K1	Evolvierter Stamm BJH30 aus Adaptionsansatz 2, isoliert nach 6 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
BJH38	MG1655 Δ aceA Δ pta Δ pykA Δ pykF	Diese Arbeit
BJH48	MG1655 Δ Picd_untranslReg:: <i>cam_CI857_pR_pL_synthRBS</i>	Diese Arbeit
BJH58	MG1655 Δ aceA Δ pta Δ pykA Δ pykF Δ Picd_untranslReg:: <i>cam_CI857_pR_pL_synthRBS</i>	Diese Arbeit
BJH68	MG1655 Δ aceA Δ pta Δ pykA Δ pykF Δ Picd:: <i>cam_CI857_pR_pL</i>	Diese Arbeit
BJH75	MG1655 Δ aceA Δ sucCD Δ pykA Δ pykF Δ pta Δ Picd:: <i>cam_P2 Δmdh</i>	Diese Arbeit
ita1	MG1655 /pCadCs	Diese Arbeit
ita4	MG1655 Δ aceA /pCadCs	Diese Arbeit
ita6	MG1655 Δ aceA Δ sucCD /pCadCs	Diese Arbeit
ita12	MG1655 Δ aceA Δ sucCD Δ pykA Δ pykF /pCadCs	Diese Arbeit
ita19	MG1655 Δ aceA Δ sucCD Δ pykA Δ pykF Δ pta /pCadCs	Diese Arbeit
ita23	MG1655 Δ aceA Δ sucCD Δ pykA Δ pykF Δ pta Δ Picd:: <i>cam_P2</i> /pCadCs	Diese Arbeit
ita23_5.1 K3	ita23 evolviert aus Adaptionsansatz 1, isoliert nach 4 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit

ita23_5.1 K8	ita23 evolviert aus Adaptionsansatz 1, isoliert nach 4 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita23_5.2 K3	ita23 evolviert aus Adaptionsansatz 2, isoliert nach 4 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita23_5.2 K7	ita23 evolviert aus Adaptionsansatz 2, isoliert nach 4 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita32	MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF$ /pCadCs	Diese Arbeit
ita35	MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF \Delta Picd::cam_CI857_pR_pL$ /pCadCs	Diese Arbeit
ita36A	MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF \Delta Picd::cam_CI857_pR$ /pCadCs	Diese Arbeit
ita41	MG1655 $\Delta aceA \Delta sucCD \Delta pykA \Delta pykF \Delta pta \Delta Picd::cam_P2 \Delta mdh$ /pCadCs	Diese Arbeit
ita46	ita41 evolviert aus Adaptionsansatz bei 37 °C, isoliert nach 13 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita47	ita41 evolviert aus Adaptionsansatz bei 37 °C, isoliert nach 13 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita51	evolvierter ita46 isoliert nach 2 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita52	evolvierter ita47 isoliert nach 2 seriellen Verdünnungen	Diese Arbeit
ita52oP1	ita52 ohne pCadCs	Diese Arbeit
ita52oP2	ita52 ohne pCadCs	Diese Arbeit
ita52oP1_1.8 K1	ita52oP1 adaptiert bei 30 °C über 7 serielle Verdünnungen	Diese Arbeit

Tabelle 4: Primer für die Stammkonstruktion. Die homologen Sequenzen der Knockout-Primer sind unterstrichen. Die Synthese der Primer erfolgte durch *Life Technologies* (Darmstadt (DE)). ICL = Isocitratlyase, SUCS = Succinyl-CoA-Ligase, PYK = Pyruvatkinase, PTA = Phosphotransacetylase, MDH = Malatdehydrogenase, ICD = Isocitratdehydrogenase.

Primer	Primersequenz	Gen/Funktion
aceA_ko_fw	<u>GTACACAACAAATTGAAGAATTACAGAAAGA</u> <u>GTGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	<i>aceA</i> / ICL
aceA_ko_rv	<u>CGATTCTTCAGTGGAGCCGGTCAGCGCGGTGA</u> <u>CTGACATATGAATATCCTCCTTA</u>	<i>aceA</i> / ICL
aceA_check_fw	ATCTGCACATGAAAACCC	<i>aceA</i> / ICL
aceA_check_rv	TGTTGTTGCTTAGAACTG	<i>aceA</i> / ICL
sucCD_ko_fw	<u>ATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAAC</u> <u>TTTTTGCCCGCTATGGCTTGTGTAGGCTGGAG</u> CTGCTTC	
sucCD_ko_rv	<u>TTATTTTCAGAACAGTTTTTCAGTGCTTCACCGA</u> <u>TATCCGCCAGGCTGCGAACATATGAATATCCT</u> CCTTA	<i>sucCD</i> / SUCS
sucCD_check_fw	ACGCTGACGCGTCTTATCAG	<i>sucCD</i> / SUCS
sucCD_check_rv	TCGGACCGTCAAGTCGATAC	<i>sucCD</i> / SUCS
pykF_ko_fw	<u>ATGAAAAAGACCAAAATTGTTTGACCATCG</u> <u>GACCGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	<i>pykF</i> / PYK
pykF_ko_rv	<u>TTACAGGACGTGAACAGATGCGGTGTTAGTA</u> <u>GTGCCGCCATATGAATATCCTCCTTA</u>	<i>pykF</i> / PYK
pykF_for_check	GGACTGTAGAACTCAACGAC	<i>pykF</i> / PYK
pykF_rv_check	TCGCTCAAAGAAGCATCGAA	<i>pykF</i> / PYK
pykA_ko_fw	<u>ATGTCCAGAAGGCTTCGCAGAACAAAAATCG</u> <u>TTACCACGTTAGGCCAGCGTGTAGGCTGGAG</u> CTGCTTC	<i>pykA</i> / PYK
pykA_ko_rv	<u>TTACTCTACCGTTAAAATACGCGTGGTATTAG</u> <u>TAGAACCCACGGTACTCACATATGAATATCCT</u> CCTTA	<i>pykA</i> / PYK
pykA_check_fw	CGGGTCAAAGAAGCGCTGAA	<i>pykA</i> / PYK
pykA_check_rv	TTGCTGAAAACTCGCAAACC	<i>pykA</i> / PYK
Pta_ko_fw	<u>CGCCAAATCGGCGGTAACGAAAGAGGATAAA</u> <u>CCGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	<i>pta</i> / PTA

Pta_ko_rv	<u>CGGATGATGACGAGATTACTGCTGCTGTGCAG</u> <u>ACTGCATATGAATATCCTCCTTA</u>	<i>pta/</i> PTA
Pta_check_fw	CCAAATCGGCGGTAACGAAAGA	<i>pta/</i> PTA
Pta_check_rv	GGATGATGACGAGATTACTGC	<i>pta/</i> PTA
mdh_ko_fw	<u>ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG</u> <u>TATTGGCCAGGCGCTTGCGTGTAGGCTGGAGC</u> TGCTTC	<i>mdh/</i> MDH
mdh_ko_rv	<u>TTACTTATTAACGAACTCTTCGCCAGGGCGA</u> <u>TATCTTTCTTCAGCGTATCATATGAATATCCTC</u> CTTA	<i>mdh/</i> MDH
mdh_check_fw	TTGAGAAACATGCCTGCGTC	<i>mdh/</i> MDH
mdh_rv	CAATTAAGTCGTGCGCTCAA	<i>mdh/</i> MDH
D_Picd_P2_fw	<u>AAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGAT</u> <u>TATGAATTGCCGCATTATGTGTAGGCTGGAGC</u> TGCTTC	<i>P_{icd}/</i> Promotor
D_Picd_P2_rv	<u>TGCAGGGTGATCTTCTTGCCTTGTGCCGGAAC</u> <u>AACTACTTTACTTTCCATAGCTGTCCCTCTGGA</u> TCCGC	<i>P_{icd}/</i> Promotor
Icd_Promotor_fw	GTGGGCTGGTTTTCAGGTTT	<i>P_{icd}/</i> Promotor
Icd_rv	GGAGATTTTACGCTCGCCTT	<i>icd/</i> ICD
icd_nativeRBS_rv	<u>TGCGATACGGATGCTTTAGAGCAATTTTTTGT</u> <u>TAATGATTTGTAATTGGCGGATCCCAATGCTT</u> CGTTTC	<i>P_{icd}/</i> Promotor
icd_PR_nativeRBS	<u>TGCGATACGGATGCTTTAGAGCAATTTTTTGT</u> <u>TAATGATTTGTAATTGGCTTAGCTGTCTTGGTT</u> TGCCC	<i>P_{icd}/</i> Promotor

3.2. Plasmide

Das Produktionsplasmid pCadCs (Abbildung 10) wurde durch *Life Technologies* (Darmstadt (DE)) synthetisiert. Die Plasmidsequenz kann dem Anhang entnommen werden. Es enthält die codonoptimierten Gene *cadA* und *gltA*, welche für die cis-Aconitat-Decarboxylase (BAG49047.1, *A. terreus*) bzw. Citratsynthase (NP_600058.1, *C. glutamicum*) codieren. Beide Gene wurden in einem Gencluster über den konstitutiven Promotor BBA_J23100 exprimiert. Das Plasmid wurde in den konstruierten Stämmen mit den Primern *Puc_seq_fw* und *cadA_asp_rv* nachgewiesen.

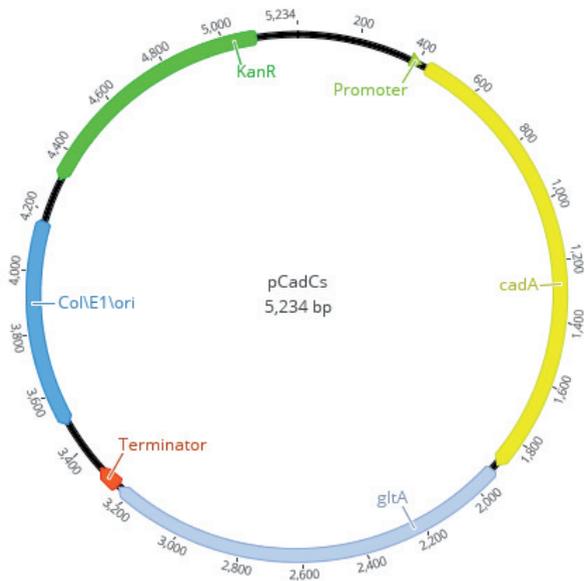


Abbildung 10: Plasmidkarte pCadCs. Promotor = BBA_J23100 aus Andersons Promotor Collection, Terminator = BBA_0010 (parts.igem.org). *cadA* = cis-Aconitat Decarboxylase aus *A. terreus* codonoptimiert, *gltA* = Citratsynthase *C. glutamicum* codonoptimiert. ColE1 ori = Replikationsursprung, KanR = Kanamycinresistenzgen.

Für den Austausch des Promotors der Isocitratdehydrogenase wurde der einzufügende Promotor in das Plasmid pKD3 integriert. Für die Integration der Promotoren BBA_J23115 (P2) und BBA_J23117 (P1) wurde das Plasmid pKD3 mit *Pkd3_P2_fw* bzw. *Pkd3_P1_fw* und *Pkd3_P_rv* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit DpnI und BamHI-HF® verdaut und nach der anschließenden Ligation in BW25141 transformiert. Die erfolgreiche Integration wurde durch Restriktionsverdau mit ClaI und BamHI nachgewiesen.

Die Konstruktion des Plasmides pKD3_Ptemp erfolgte durch Gibson Assembly. Hierfür wurde das Plasmid pPL451 (enthält *CI857*, *pRM*, *pR* und *pL*) mit den Primern *PPL3_Ass* und *PPL4_Ass*, und das Plasmid pKD3_P1 mit dem Primern *pKD3_AssPT_2_fw* und *pKD3_AssPT_2_rv* amplifiziert. Die Ligation der Fragmente erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Gibson Assembly Kit (NEB). Das so konstruierte Plasmid pKD3_Ptemp (Abbildung 11) wurde mit den Primern *PPL3* und *PPL4* und durch Verdau mit *XbaI* überprüft.

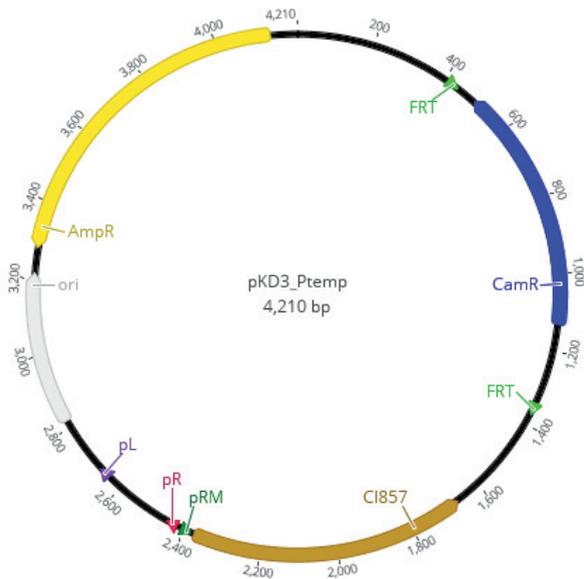


Abbildung 11: Plasmidkarte pKD3_Ptemp. *CamR/AmpR* = Chloamphenicolresistenzen/ Ampicillinresistenzen, *ori* = Replikationsursprung, *CI857* = temperatursensitiver Repressor, *pRM/pR/pL* = Promotoren, *FRT* = Sequenzen für FLP vermittelte Rekombination.

Kryokulturen der mit den Plasmiden transformierten Stämme DH5 α oder BW25141 wurden bei -80 °C gelagert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem NueloSpin[®] Plasmid Kit (VWR, Radnor (US)).

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCadCs	BBa_J23100_cadA_gltA_T, KanR, ColE, (T=Terminator (BBa_0010))	Diese Arbeit
pCP20	FLP Rekombinase	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pKD3	<i>FRT_cam_FRT</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	<i>FRT_kan_FRT</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	<i>P_{araB}_gam_bet_exo</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3_P1	<i>FRT_cam_FRT_BB</i> a_J23117	Diese Arbeit
pKD3_P2	<i>FRT_cam_FRT_BB</i> a_J23115	Diese Arbeit
pKD3_Ptemp	<i>FRT_cam_FRT_CI857_p_{RM}_p_R_p_L</i>	Diese Arbeit
pPL451	<i>CI857, p_{RM}, p_R, p_L</i>	(Love et al., 1996)

Tabelle 6: Primer für die Plasmidkonstruktion. Sequenzen homolog zur zu amplifizierenden Nukleinsäure sind unterstrichen. Die Ribosomenbindestelle ist fett hervorgehoben.

Primer	Primersequenz	Plasmid
Pkd3_P2_fw	ACTGGATCCGCTAGCATTGTACCAAGGGCTG AGCTAGCTATAAA <u>TCCATATGAATATCCTCC</u>	pKD3_P2
Pkd3_P_rv	TACGGATCC <u>AGGAGGACAGCTTAATTCCCA</u> <u>TGTCAGCCGTTAAGTG</u>	pKD3_P2
Puc_sequ_fw	<u>GTA</u> AAACGACGGCCAGT	pCadCs
cadA_asp_rv	<u>AACCAGCGACTTTTAACCG</u>	pCadCs
PPL3_Ass	AAGGAGGATATTCATATGG <u>ACCATGATTACG</u> <u>AATTGCC</u>	pKD3_Ptemp
PPL4_Ass	GGAATTAAGCTGTCCTCCTG <u>AGTTAACCTCC</u> <u>TTAGGATCC</u>	pKD3_Ptemp
pKD3_AssPT_2_rv	<u>TCCATATGAATATCCTCCTTAG</u>	pKD3_Ptemp
pKD3_AssPT_2_fw	<u>CAGGAGGACAGCTTAATTC</u>	pKD3_Ptemp
PPL3	TAAGATATCCCATGATTACGAATTGCCGGC	pKD3_Ptemp

PPL4	TAAGAATTCAGTTAACCTCCTTAGGATCCCA ATGCTT	pKD3_Ptemp
Pkd3_P1_fw	ACTGGATCCGCTAGCACAAATCCCTAGGACTG AGCTAGCTGTCAATCCATATGAATATCCTCC	pKD3_P1

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit dem Puregene Yeast/Bact. Kit B (Quiagen, Hilden (DE)) isoliert. Abweichend von dem für gramnegative beschriebenen Protokoll wurden die Zellen nicht durch die Inkubation bei 80 °C sondern durch Verdau mit Proteinase K (Life Technologies) lysiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 1000 bestimmt. Für die Genomsequenzierung wurden mehrere Präparationen vereint um genug DNA zu erhalten.

3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Wanner-PCR

Die PCR-Produkte für die Konstruktion von Deletionsmutanten wurden mit dem in Tabelle 7 angegebenen PCR-Ansatz und Programm generiert.

Tabelle 7: PCR für Wanner KO

PCR-Ansatz	PCR-Programm
75 µl H ₂ O	1. 94 °C 3 min
10 µl Q5 Reaktionspuffer	2. 94 °C 0,5 min
6 µl MgCl ₂ (25 mM)	3. 50 °C 0,5 min
2 µl dNTPs (10 mM)	4. 72 °C 2 min
1µl Primer fw (1µg/µl)	50 Zyklen Schritt 2-4
1 µl Primer rv (1µg/µl)	5. 72 °C 5 min
0,5 µl Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	6. 4 °C Pause
5 µl template DNA	

Q5-PCR

Die Q5-PCR erfolgte nach Herstellerangaben (NEB). Die Annealing-Temperatur und die Elongationsdauer wurden an die Primer und die Länge des Produktes angepasst. Die optimalen Temperaturen wurden mit dem NEBuilder® Assembly Tool oder dem Tm Calculator (NEB) bestimmt.

Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde die Kolonie in 10 µl Wasser gelöst. Dann wurden 10 µl eines Master-Mixes bestehend aus *Taq* 2x Master Mix (NEB) und je 0,2 µM der Primer hinzugegeben. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm: 2 Minuten bei 96 °C, 35x (1 Minute bei 96 °C, 0,5 Minuten bei 60 °C, 1,5-2 Minuten bei 72 °C), 10 Minuten bei 72 °C mit anschließender Kühlung bei 4 °C.

3.3.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (VWR). Die DNA-Konzentration wurde danach mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

In wenigen Fällen erfolgte die Aufreinigung durch Fällung der DNA mit Ethanol. Die DNA-Lösung (100 µl) wurde dafür zunächst mit 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform gevortext und dann für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde entnommen und mit einem Zehntel Volumen kaltem Natriumacetat (3 M) und einem Volumen 95 % eiskaltem Ethanol versehen. Der Ansatz wurde 5 Sekunden gevortext und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA pelletiert (30 min, 13000 rpm), mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die so gereinigte DNA wurde anschließend in 30 µl Wasser aufgenommen.

3.3.4. Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel (1 % w/v in TPE) durch eine Spannung von 70 V in 60 Minuten (BIO-RAD POWER PAC 200/300) nach der Größe aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TPE (10,8 g/l TRIS und 0,074 g/L EDTA, pH 7,5 mit 85 % Phosphorsäure) verwendet. Für die Visualisierung der Nukleinsäuren wurde das Gel mit dem Roti®-GelStain gefärbt (Zugabe zur flüssigen Agarose). Die Darstellung der Banden erfolgte über einen UV-Tisch der Firma Life Technologies (TFX-20M).

3.3.5. Restriktionsverdau und Ligation

Beim Verdau mit mehreren Enzymen wurden die Restriktionsenzyme mit dem Double Digest Finder (NEB) nach möglichst hoher Aktivität im gleichen Puffer ausgewählt. Der Restriktionsverdau erfolgte standardmäßig in einem Volumen von 50 µl mit 1 µg DNA für 1 h bei 37 °C. Konnten die Enzyme anschließend nicht per Hitze (65 °C, 20 Minuten) inaktiviert werden, so folgte die Aufreinigung über das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (VWR).

Für die Konstruktion von pKD3_P1 und pKD3_P2 wurde 200 ng des verdauten PCR-Produktes mit der T4-DNA-Ligase (Promega, Madison (US)) für 2 h bei Raumtemperatur ligiert.

Anschließend wurde die Ligase durch Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert und 3 µl des Ligationsansatzes in BW25141 transformiert.

3.3.6. Elektroporation

Für die Elektroporation wurde frisches LB₀/LB-Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft (Verdünnung 1:100) und nach dem Erreichen einer OD₆₅₀ von ca. 0,8 geerntet (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Für die Erstellung von kompetenten Zellen (mit pKD46) für die homologe Rekombination wurde die Kultur mit 1 mM Arabinose induziert. Das gewonnene Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem Wasser (gleiches bzw. halbes Kulturvolumen) gewaschen und in 10 % (v/v) kaltem Glycerin (1 % des Kulturvolumens) aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (2 Minuten, 10000 rpm) wurde das Zellpellet in 160 µl kaltem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden dann aliquotiert (10 µl) und wenn nicht benötigt bei -80 °C gelagert. Zu den elektrokompenten Zellen wurden dann 300-900 ng der DNA (Plasmid oder PCR-Produkt) gegeben und in eine 2 mm breite Küvette mit einem Fassungsvermögen von 400 µl transferiert. Sofort nach Ende der Elektroporation (2500 Volt) wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben. Der Elektroporationsansatz wurde anschließend für 1 h bei geeigneter Temperatur unter Schütteln (300 rpm) im Thermoschüttler inkubiert. Die Selektion erfolgte über Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum.

3.3.7. Transformation in chemisch kompetente Zellen

Für die Transformation durch Hitzeschock wurde eine Übernachtskultur mit frischem LB₀/LB-Medium 25-fach verdünnt und bis zu einer OD₆₅₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Die Zellbrühe wurde abzentrifugiert (90 %, 5 Minuten, Hettich, Tuttlingen (DE)) und in 200 µl CaCl₂ (0,1 M) resuspendiert. Dann wurde das Plasmid hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren mit den Zellen vermischt. Nach 40 Minuten auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden (Thermoschüttler, Eppendorf). Anschließend wurde das Eppi für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Im Falle einer geringen Transformationseffizienz (z.B. beim pKD46 Plasmid) wurden die Zellen anschließend in 500 µl LB₀/LB-Medium für eine Stunde im Thermoschüttler bei 300 rpm und geeigneter Temperatur (30 bzw. 37 °C) inkubiert. Die Selektion erfolgte über Nacht auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum.

3.4. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit MilliQ-Wasser (Millipore Gradient) hergestellt. Für feste Medien wurden zusätzlich 20 g/l Agarose eingewogen.

LB₀/LB

Das LB₀-Medium bestand aus 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl. Es wurde für 20 Minuten bei 120 °C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Für das LB-Medium wurden zusätzlich nach dem Autoklavieren 2 g/l Glucose und 2,5 mM CaCl₂ hinzugefügt.

Slant

Dieses Medium setzte sich aus 20 g/l Bacto™ Trypton (BD, Franklin Lakes (US)), 10 g/l Hefeextrakt und 2 % (v/v) Glycerin zusammen. Das Medium wurde wie oben beschrieben autoklaviert.

Für die Kryokulturen wurde die Konzentration des Glycerins auf 50 % (v/v) erhöht.

SOC

Für das SOC-Medium wurden 20 g/l Trypton, 2,5 g/l Hefeextrakt, 0,29 g/l NaCl und 0,37 g/l KCl eingewogen. Nach dem Autoklavieren wurden 1 % (v/v) einer Mg-Stocklösung (1 M MgCl₂ und 1 M MgSO₄) sowie 4 g/l Glucose hinzugefügt.

MOPS-Medium (Causev et al., 2003)

Tabelle 8: Zusammensetzung des MOPS-Mediums

Substanz	Konzentration
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	20,92 g/l
KH ₂ PO ₄	3,5 g/l
K ₂ HPO ₄	5 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,5 g/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,25 g/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	15 mg
Thiamin	0,5 mg

MgSO₄, CaCl₂ und Thiamin wurden separat gelöst. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7,1 eingestellt. Das Medium wurde anschließend sterilfiltriert (0,2 µM, Carl Roth, Karlsruhe (DE)). Zum Medium wurde dann 1 % (v/v) der Spurenelementlösung (Tabelle 9) gegeben sowie 4 g/l Glucose und gegebenenfalls ein Antibiotikum bzw. Glutamat (1,5 g/l).

Spurenelementelösung für MOPS-Medien (100-fach) (Causey et al., 2003)

Tabelle 9: Zusammensetzung der Spurenelementelösung für das MOPS-Medium

Substanz	Konzentration
FeCl ₃ *6H ₂ O	220 mg/l
CoCl ₂ *6H ₂ O	20 mg/l
CuCl ₂	10 mg/l
ZnCl ₂	13,1 mg/l
NaMoO ₂ *2 H ₂ O	23,4 mg/l
H ₃ BO ₃	5 mg/l

Die Komponenten der Spurenelementelösung wurden in 0,1 M HCL gelöst und sterilfiltriert (0,2 µM).

MOPS3-Medium für Bioreaktorkultivierung von ita23

Als Grundlage diente das MOPS-Medium (Tabelle 8). Die Konzentration von MgSO₄*7H₂O wurde auf 0,5 g/l, die Glutamatkonzentration auf 6 g/l und die Glucosekonzentration auf 27 g/l erhöht. Zudem erfolgte keine Pufferung durch MOPS. Das Medium wurde sterilfiltriert (0,2 µM).

MOPS4-Medium für Bioreaktorkultivierung von ita36A

Das MOPS-Medium (Tabelle 8) wurde durch die Erhöhung der MgSO₄*7H₂O Konzentration auf 0,5 g/l und der Glucosekonzentration auf 30 g/l angepasst. Um Schaumbildung vorzubeugen wurde 0,005 % (v/v) Antifoam 204 (Sigma-Aldrich, St. Louis (US)) hinzugegeben. Das Medium wurde sterilfiltriert (0,2 µM).

Feed 3 (für ita23)

Die Feedlösung enthielt 300 g/l Glucose, 9 g/l Glutamat und 52,5 g/l (NH₄)₂SO₄. Die Feedlösung wurde sterilfiltriert (0,2 µM).

Feed 4 (für ita36A)

Die Feedlösung enthielt 300 g/l Glucose, 52,5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,005 % (v/v) Antifoam 204 und 0,025 g/l Kanamycin. Die Feedlösung wurde sterilfiltriert (0,2 µM).

TN-Platten (Tanaka et al., 1967)

Tabelle 10: Zusammensetzung der Tanaka-Platten

Substanz	Konzentration
LösungA (10x)	
NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O	53,13 g/l
K ₂ HPO ₄	111,5 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,4 g/l
LösungB (100x)	
1 M HCL	1 ml/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O	28 mg/l
MgSO ₄ *7 H ₂ O	7,4 mg/l
ZnCl ₂	13,5 mg/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	147 mg/l

10 ml von Lösung B wurden mit 12 g Agar und 890 ml H₂O gemischt und bei 120 °C, 2 bar für 20 Minuten autoklaviert. Anschließend wurde 100 ml der autoklavierten Lösung A, die benötigten C-Quellen (Glucose 2 g/l, Glutamat 1,5 g/l) sowie das jeweilige Antibiotikum hinzugegeben.

Antibiotika

Von allen Antibiotika wurden 100-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Chloramphenicol (2,5 mg/μl) und Ampicillin (10 mg/ml) wurden in 50 % (v/v) Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert. Kanamycin (2,5 mg/ml) wurde in Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

3.5. Kultivierung

3.5.1. Kultivierung im Schüttelkolben

Für die Schüttelkolbenkultivierungen wurden die Stämme zunächst auf einer geeigneten Agarplatte angezogen. Anschließend wurde eine erste Vorkultur in Komplexmedium (LB₀ bzw. für ita19, ita23, BJH30, BJH58, ita35 und ita36A in LB) angeimpft und für 7-17 h bei geeigneter Temperatur inkubiert. Diese Kultur wurde dann mit MOPS-Medium verdünnt (≥ 1:25) und über Nacht inkubiert. Diese zweite Vorkultur diente dann als Inoculum für die Hauptkultur. Hierfür wurde die benötigte Menge an Vorkultur für eine Start-OD₄₂₀ von 0,4 abzentrifugiert und einmal mit MOPS-Medium gewaschen.

Enthielten die Stämme kein temperatursensitives Plasmid, so erfolgte die erste Vorkultur generell in Reagenzgläsern bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 140 rpm (GFL 3020, GFL, Burgwedel (DE)) und einer Temperatur von 37 °C. Eine Ausnahme stellten die Stämme BJH30, ita19, ita23, BJH75, ita41 sowie die adaptierten Stämme dar, welche durchgängig bei 30 °C und 200-250 rpm kultiviert wurden. Die Kultivierungen erfolgten in Schüttelkolben mit 4 Schikanen und einem Füllvolumen von 10 %. Die Kultivierungen bei 30 °C erfolgten im Schüttelbrutschrank (Certomat KS-1, Braun Biotech International, Melsungen (DE)) bei 200-250 rpm, die Kultivierungen bei 37 °C im Brutraum bei 250 rpm (KS 15 A, Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)). Abweichungen von dem hier beschriebenen Vorgehen werden im Ergebnisteil erwähnt und diskutiert.

3.5.2. Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierungen erfolgten in Multifors-Bioreaktoren (Infors, Einsbach (DE)) mit einem Startvolumen von 400 ml (maximales Füllvolumen 1000 ml). Die Temperatur wurde über den ganzen Zeitraum konstant gehalten. Neben der Temperatur wurden auch kontinuierlich der pH-Wert (Mettler Toledo 405-DPAS), der Sauerstoffpartialdruck (Mettler Toledo 6800) und das Redoxpotential (Mettler Toledo Pt4805-DPAS) aufgezeichnet. Das Abgas wurde über den Abgaskühler gekühlt und über eine Schottflasche (zum Auffangen von Schaum) zu den BlueSens-Sensoren zur Bestimmung der O₂ und CO₂-Konzentration geleitet. Zunächst wurde eine Rührerdrehzahl von 550 rpm und eine Begasungsrate von 1 vvm (Volumenstrom Luft/ Volumen der Flüssigkeit [1/min]) eingestellt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde durch Anpassung der Rührerdrehzahl über 30 % gehalten.

ita23

Für die Kultivierung von ita23 wurde eine LB-Übernachtskultur mit Kanamycin angesetzt. Die zweite Vorkultur erfolgte in MOPS-Medium mit Kanamycin, 4 g/l Glucose und 1,5 g/l Glutamat bei 30 °C. Ein Kulturvolumen für eine Start-OD₄₂₀ von 1 wurde bei 5000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific) und mit MOPS-Medium gewaschen. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in MOPS3-Medium aufgenommen und über ein Septum in den Bioreaktor überführt.

Für die manuellen Feedpulse wurde das Medium Feed3 verwendet. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte zunächst über 1 M NaOH (0-29 h) und danach über 2 M NaOH.

ita36A

Die Vorgehensweise für die Kultivierung von ita36A war abhängig von der Prozessführung. Der Stamm wurde zunächst auf eine TN-Platte mit Kanamycin und Glucose als C-Quelle ausgestrichen. Mehrere Kolonien von dieser Platte wurden dann in MOPS-Medium mit 4 g/l Glucose und Kanamycin überimpft. Für den einstufigen Prozess wurde die Kultur zunächst für 8 h bei 37 °C und danach für weitere 16 h bei 28 °C kultiviert. Für den zweistufigen Prozess wurde die Vorkultur für 24 h bei 37 °C kultiviert. Die benötigte Menge Vorkultur wurde dann

abzentrifugiert, gewaschen, pelletiert und in MOPS4-Medium aufgenommen. Die Zugabe in den Bioreaktor erfolgte steril über ein Septum.

Die Zufütterung erfolgte manuell mit dem Feed4-Medium. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte zunächst über 2 M NaOH (einstufiger Prozess: 0-48 h, zweistufiger Prozess: 0-24 h) und später über 5 M NaOH. Die Ammoniumkonzentration wurde durch manuelle Zugabe von 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (einstufiger Prozess: 47 h, zweistufiger Prozess: 10 h) während der Kultivierung angepasst. Zur Schaumzerstörung wurde manuell 0,005 % (v/v) Antifoam 204 zugegeben.

3.6. Probennahme und Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse wurde 1 ml Kulturbrühe entnommen und die optische Dichte bei 420 nm in Minimalmedium und bei 650 nm in Komplexmedien bestimmt. Das verbliebene Probenvolumen wurde für 5 Minuten bei 14800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Analytik eingefroren. Bei den Bioreaktorproben vom Stamm ita36A kam es durch das Einfrieren zur Kristallisation weshalb ein Teil der Probe bei 4 °C gelagert und schnellstmöglich der Analytik zugeführt wurde.

Die Biomassenkonzentration ergibt sich durch Multiplikation der optischen Dichte mit dem Faktor 0,21 BTM [g/l]/OD₄₂₀.

3.7. Bestimmung der extrazellulären Metabolite

3.7.1. Enzymatische Bestimmung

Die Bestimmung von Glucose, Acetat und Glutamat erfolgte mit Enzymkits von Megazyme. Es wurde eine Standardreihe angesetzt, welche zur Berechnung der Konzentration diente. Die Proben wurden mit MilliQ-Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte im BioTek Epoch (Winooski, USA) bei der entsprechenden Wellenlänge.

3.7.2. Bestimmung über HPLC

Die Metabolite Itaconat, Pyruvat, Laktat, Citrat und cis-Aconitat wurden über die Reversed-Phase Säule Inertsil® ODS-3 (RP-18 100 Å, 250 x 4,6 mm) chromatographisch getrennt. Die Messung erfolgte mit einem HPLC-System von Agilent (1100 series) ausgestattet mit einem DAD-Detektor. Die Elution der Probe (10 µl) erfolgte mit 0,1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 40 °C. Die Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche durch Vergleich mit einer Standardlösung.

3.8. Bestimmung der Enzymaktivität

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde zunächst eine 50 ml-Hauptkultur angesetzt (siehe 3.5.1.). Ein Kulturvolumen von 40 ml wurde nach 4 h (37 °C) bzw. 7,5 h (28/30 °C) für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit MOPS-Medium mit anschließender Resuspension in Na-Phosphat-Puffer (0,2 M pH 6,2) für den Cis-Aconitat-Decarboxylase- und Citratsynthase-Assay, oder in Tris-Acetat Puffer (0,16 M pH 7,6) für den Isocitratdehydrogenaseassay. Ein Volumen von 3 ml wurde anschließend für den Ultraschallaufschluss verwendet. Der Aufschluss erfolgte im gekühlten 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit dem BRANSON Digital Sonifier mit einer Pulszeit von 1-2 Minuten. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 15 Minuten bei 14800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Enzymlösung) wurde entnommen und bis zur Messung auf Eis gekühlt. Gegebenfalls wurde der Zellextrakt mit dem entsprechenden Puffer verdünnt.

Bradford-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach (Bradford, 1976). Für die Bradford-Reagenz wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 95 % (v/v) Ethanol gelöst. Weiterhin wurde 100 ml 85 % (w/v) Phosphorsäure hinzugegeben und das Volumen mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.

Zunächst wurde eine Standardreihe (0,025 g/l – 0,5 g/l) mit einem Bovine Serum Albumin (BSA) Standard (2 mg/mol, Thermo Fisher) angesetzt. Die Proteinproben wurden gegebenenfalls verdünnt. Jeweils 20 µl des Standards oder der Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versehen. Die Messung erfolgte nach ca. 2 Minuten in einer Küvette bei 595 nm. Über die Standardgerade konnte dann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

Cis-Aconitat-Decarboxylase

Die Bestimmung der Aktivität der cis-Aconitat-Decarboxylase erfolgte nach Kanamasa et al. (2008). Der Reaktionsansatz bestand aus 50 µl Enzymlösung, 200 µl cis-Aconitat (60 mM) und 1250 µl Natrium-Phosphat-Puffer (0,2 M pH 6,2). Dieser wurde für 10 Minuten bei 30 °C im Thermoschüttler inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3, 6 und 10 Minuten) wurde 200 µl Probe entnommen, mit 50 µl 1 M HCL gestoppt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde über die HPLC die Zunahme der Itaconatkonzentration bestimmt. Die Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mgProtein}} \right] = \frac{\Delta \text{Itaconat} [\text{mM}]}{\Delta t [\text{min}]} \times 1000 \times \frac{1}{c_E \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right]} \quad (\text{Gleichung 3.8.1})$$

$\Delta \text{Itaconat} [\text{mM}]/\Delta t [\text{min}]$ = zeitliche Änderung der Itaconatkonzentration bestimmt durch lineare Regression

c_E [mg/ml] = Proteinkonzentration in der Enzymlösung bestimmt durch Bradford-Assay

Citratsynthase

Die Aktivität der Citratsynthase wurde über die Bildung von Coenzym A nach Vuoristo et al. (2015a) bestimmt. Die freie Thiolgruppe reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure unter Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoat, welches bei 412 nm quantifiziert werden kann. Die Aufnahme der Kinetik bei 412 nm erfolgte mit dem BioTek Power Wave XS (Winooski, USA).

Der Reaktionsansatz bestand aus 20 μ l Enzymlösung und 180 μ l des Reaktionsmixes

Reaktionsmix: 0,31 mM Acetyl-CoA, 0,5 mM Oxalacetat, 0,1 mM DNTB und 0,25 % (v/v) Triton X-100 gelöst in 100 mM TrisHCl (pH 8)

Die Aktivität wurde nach Gleichung 3.8.2 bestimmt.

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mgProtein}} \right] = \frac{\Delta E}{\Delta t [\text{min}]} \times \frac{V_L [\text{ml}]}{V_E [\text{ml}] \times d [\text{cm}] \times \epsilon \left[\frac{1}{\text{mM cm}} \right]} \times \frac{1}{c_E \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]} \quad (\text{Gleichung 3.8.2})$$

$\Delta E/\Delta t$ = Änderung der Absorption bei 412 nm über die Zeit, bestimmt durch lineare Regression

V_L [ml] = Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes

V_E [ml] = Volumen der eingesetzten Enzymlösung

c_E [mg/ml] = Konzentration der Enzymlösung bestimmt durch Bradford-Assay

ϵ [1/(mM cm)] = Exkinktionskoeffizient, bei 30 °C nach Morgunov and Srere (1998): 13,6

Isocitratdehydrogenase

Die Bestimmung der Isocitratdehydrogenaseaktivität erfolgte nach Olano et al. (1995). Der Reaktionsansatz bestand aus 20 μ l Enzymlösung, 20 μ l DL-Isocitrat (30 mM) und 160 μ l des Reaktionsmixes (0,8 mM NADP⁺; 3 mM MgCl₂ in 0,16 M Tris-Acetat Puffer (pH 7,6)). Die Zunahme der NADPH-Konzentration wurde bei 340 nm gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Gleichung 3.8.2 mit folgenden Parametern:

$\Delta E/\Delta t$ = Änderung der Absorption bei 340 nm über die Zeit, bestimmt durch lineare Regression

ϵ [1/(mM cm)] = Exkinktionskoeffizient bei 30 °C nach Olano et al. (1995): 5,0

3.9. Bestimmung der Expressionsstärke

3.9.1. RNA-Isolierung

Zur Bestimmung der Expressionsstärke wurde 1 ml Probe mit einer OD₄₂₀ von 2 entnommen und mit der doppelten Menge RNAprotect Bacteria Reagent (Quiagen) für 5 Sekunden gevortext. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren erfolgte mit dem Master Pure RNA Purification Kit (Epicentre, Madison (US)). Die Vorgehensweise, welche den zweifachen DNase-Verdau beinhaltete (C. Removal of Contaminating DNA, Schritt 1-11), entsprach den Herstellerangaben. Die RNA wurde final in H₂O resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.9.2. Reverse Transkription

Zunächst wurde die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop 1000 bestimmt. Für die reverse Transkription wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Waltham (US)) verwendet. Es wurden jeweils 2 Ansätze für jede Probe angesetzt, welche nach der Synthese dann zu einer cDNA-Lösung vereint wurden.

Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA mit 1 µl Random Hexamer Primer gemischt und mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zur Aufhebung von Sekundärstrukturen anschließend für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Reaktionspuffer (5x), 0,5 µl Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugefügt. Die Synthese erfolgte im Thermocycler (Biometra T3, Biometra, Göttingen (DE)) nach folgendem Programm: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Die Proben wurden dann anschließend für maximal 2 Wochen bei -20 °C gelagert.

3.9.3. Real-Time PCR

Es wurden jeweils drei Ansätze pro Probe mit dem MESA Green qPCRTM Mastermix Plus (Eurogentec, Lüttich (B)) angesetzt. Jeder Ansatz enthielt 1,6 µl cDNA, Primer for/rev (je 4 ng/µl), 12,5 µl MESA Green Mastermix, aufgefüllt mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl. Neben den zu messenden Genen wurden pro Probe auch mindestens 3 Referenzgene (*ybhC*, *rpoD*, *recA* oder *infA*) mitgemessen. Die Messung erfolgte im Rotorgene Cycler (RG 6000, Corbett life science, Mortlake (AUS)) mit folgendem Programm: 10 Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen (15 Sekunden bei 95 °C, 60 Sekunden bei 60 °C) und schließlich in 1 °C-Schritten von 50 auf 95 °C (erster Schritt 90 Sekunden, danach alle 5 Sekunden).

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode über die Software qBase^{Plus} (Biogazelle, Gent (B)) (Hellemans et al., 2007). Die Proben wurden dabei auf die

Expression stabil exprimierter Referenzgene normalisiert. Die Effizienzen der verwendeten Primerpaare wurden zuvor über eine Verdünnungsreihe mit genomischer DNA bestimmt.

3.10. Adaptive Evolution und Genomsequenzierung

Für die Adaption wurden 200 µl einer LB-Vorkultur von einer Einzelkolonie in MOPS-Medium überführt. Diese Kultur stellte die Startkultur für die Adaption dar. Bei ausreichender optischer Dichte (nach mindestens 3 Verdoppelungen), wurde diese Kultur dann mit frischem MOPS-Medium auf eine OD₄₂₀ von 0,05-0,1 verdünnt. Die Wachstumsrate wurde während der Adaption über zwei Datenpunkte abgeschätzt. Aliquots der verschiedenen Adaptionsansätze wurden bei -80 °C gelagert. Die Isolierung der adaptierten Klone erfolgte durch Ausplattieren auf eine geeignete Agarplatte (LB ± Antibiotikum). Die Anzahl der Generationen wurde über die OD₄₂₀-Differenz berechnet: $n = \log_2 (OD_{420,E}/OD_{420,A})$ (A= Anfang, E= Ende).

Genomische DNA der adaptierten Stämme und des Ausgangsstammes wurden an das Max-Planck-Genomzentrum in Köln geschickt, wo zunächst eine DNA-Bibliothek erstellt wurde, welche dann mit einem Illumina Hiseq Sequencer ausgelesen wurde. Die bioinformatische Auswertung, welche ebenfalls vom Genomzentrum durchgeführt wurde, beinhaltete das Mapping der Reads gegen das Referenzgenom (U00096.3) mit anschließender SNP (Einzelnukleotid-Polymorphismus)-Detektion. Hierfür wurde die CLC Genomics workbench (Quiagen) verwendet. Folgenden Parameter wurden eingestellt:

Mapping Options

Mismatch Cost 2, Linear gap cost, Insertion cost 3, Deletion cost 3, Length fraction 0,8, Similarity fraction 0,8. Non-specific match handling: Map randomly.

Basic Variation Detection

Ignore positions with coverage above 100000. Read filters: Ignore broken pairs, Ignore non-specific matches reads. Coverage and count filters: Minimum coverage 10, Minimum count 2, Minimum frequency 35 %.

Größere Deletionen wurden über das Programm Genious 11.0.3 (Biomatters, Auckland (NZ)) identifiziert.

3.11. Berechnung von Ausbeuten und Raten

Für die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate wurde der natürliche Logarithmus der optischen Dichte gegen die Kultivierungszeit aufgetragen. Die Wachstumsrate ergibt sich aus der Steigung der linearen Regression dieser Datenpunkte.

Die Ausbeuten wurden in der exponentiellen Wachstumsphase nach der Formel $Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$ über die Menge des gebildeten Produktes (ΔP) in Relation zum verbrauchten Substrat (ΔS) bestimmt. Gesamtausbeuten, insbesondere von Itaconat, wurden über die Messwerte der letzten Probe bestimmt.

Die spezifischen Aufnahme- und Produktionsraten r_M [mmol/g BTM/h] wurden in der exponentiellen Phase nach der Formel $r_M = \mu \frac{\Delta M}{\Delta X}$ bzw. in der stationären Phase über die Formel $r_M = \frac{\Delta M}{\bar{X}}$ bestimmt (mit ΔM = Menge des gebildeten oder verbrauchten Metaboliten [mmol/l], ΔX = Menge der gebildeten Biomasse, \bar{X} = über Zeitintervall gemittelte Biomasse [g BTM/l]). Die gemittelte volumetrische Produktivität q_P entspricht der Änderung der Produktkonzentration im Fermenter (ΔP in g/l) normiert durch die Zeit Δt : $q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t}$.

Die Standardabweichung der Messdaten wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{STABW} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (\text{Gleichung 3.11.1})$$

mit $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ dem Mittelwert der Messwerte, x_i der einzelnen Messwerte und n der Anzahl der Messwerte

Für die Berechnung der Kohlendioxidbildungsrate wird angenommen, dass Stickstoff inert ist, also nicht verbraucht wird ($x_{N_2}^{E/A} = 1 - x_{O_2}^{E/A} - x_{CO_2}^{E/A}$). Die Kohlendioxidbildungsrate r_{CO_2} ergibt sich durch Subtraktion des Kohlendioxids am Eingang vom Ausgang ($r_{CO_2}^A - r_{CO_2}^E$). Nach Umformen ergibt sich :

$$r_{CO_2} \text{ [mmol/h]} = \frac{1000 \times V' \times p \times x_{CO_2}^E}{R \times T} \times \left[\frac{x_{CO_2}^A (1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E)}{x_{CO_2}^E (1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A)} - 1 \right] \quad (\text{Gleichung 3.11.2})$$

mit:

V' = Volumenstrom Zuluft [l/h]

p = Normdruck = 1,0133 bar

R = Gaskonstante = $8,314 \times 10^{-2}$ bar l/mol K

T = Temperatur [K]

$x_i^{E/A}$ = Anteil des Metaboliten i in der Zuluft (E) oder Abluft (A) [%] dividiert durch 100

Berechnung der Kohlenstoffbilanz:

Für die Berechnung des Kohlenstoffanteils der Produkte und der Biomasse wurden die Konzentrationsdifferenzen [g/l oder mmol/l] oder die absoluten Werte [g oder mmol] verwendet. Für die Bestimmung des Kohlendioxids wurden zunächst die Bildungsraten [mmol/h] über die Zeit aufgetragen. Anschließend wurde eine passende Funktion zur Annäherung der Messdaten ausgewählt und die Fläche unter der Funktion für den betrachteten Zeitraum integriert. Dadurch wurde die absolute Konzentration des gebildeten CO₂ bestimmt [mmol]. Die C-Bilanz wurde dann für jedes Produkt über folgende Formel bestimmt:

$$xC_{\text{Produkt}} [\%] = \frac{n_p \times \Delta P}{n_s \times \Delta S} \times 100 \quad (\text{Gleichung 3.11.3})$$

mit:

n_p, n_s = Anteil des Kohlenstoffs im Produkt (P) oder Substrat (S) (Anzahl der Kohlenstoffatome x 0,012 g/mmol, für die Biomasse 0,49 g/g)

3.12. Netzwerkmodell des Zentralstoffwechsels von *E. coli*

Zur Modellierung des Zentralstoffwechsels in *E.coli* wurde das Modell von Hädicke and Klamt (2010) um die Itaconatbiosynthese erweitert. Es umfasst 114 Reaktionen und 93 Metabolite, die im Anhang in Tabelle A1 und A2 aufgelistet sind. Reaktionen die während der iterativen Stammkonstruktion neu eingefügt wurden sind in Tabelle A1 orange hinterlegt. Eine graphische Darstellung der katabolischen Stoffwechselwege des Modells findet sich in Abschnitt 4.4 (Abbildung 18). Die Analyse des Modells und alle Berechnungen von Elementarmoden und von Minimal Cut Sets wurden mit der Matlab-Toolbox CellNetAnalyzer (Klamt et al., 2007)) durchgeführt (Version 2017.2).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Analyse des Modells in Bezug auf maximale Produktion und Wachstum

Durch eine Analyse des stöchiometrischen Modells des Zentralstoffwechsels von *E.coli* sollten die maximalen Ausbeuten von Itaconat und Biomasse mit Glucose als Substrat bestimmt und die möglichen Synthesewege für Itaconat identifiziert werden. Um die optimale Produktion von Itaconat zu untersuchen wurde zunächst eine Elementarmodenanalyse durchgeführt. Die Berechnung erfolgte mit dem initialen Modell ohne Flussgrenzen und ohne die Aufnahme von Glutamat und die Ausscheidung von Pyruvat. Für die aeroben Bedingungen wurde eine inaktive Pyruvat-Formiat-Lyase angenommen. Für *Aspergillus terreus* ist bekannt, dass die Sauerstoffverfügbarkeit entscheidend die Überproduktion von Itaconat beeinflusst (Gyamerah, 1995b). Ein Vorteil von *E. coli* ist, dass es auch unter anaeroben Bedingungen wachsen und Itaconat produzieren kann (Vuoristo et al., 2015b). Für die anaerobe Produktion ergeben sich 90 Elementarmoden mit maximaler Itaconatproduktion. Ohne externen Elektronenakzeptor muss jedoch für eine ausgeglichene Redoxbilanz ein reduziertes Nebenprodukt wie beispielsweise Ethanol gebildet werden (Abbildung 12a). Somit ist theoretisch nur eine Ausbeute von 0,5 mol/(mol Glucose) möglich, wohingegen mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor Ausbeuten von bis zu 1 mol/(mol Glucose) erreichbar sind. Für die maximale aerobe Itaconatproduktion ergibt sich dementsprechend folgende Reaktionsgleichung:



Insgesamt finden sich 104 Elementarmoden mit maximaler Ausbeute. Die Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen daher nur die 7 wichtigsten Klassen der möglichen optimalen Pfade zum Itaconat. Essentiell für die aerobe Produktion mit maximaler Ausbeute (in allen optimalen Elementarmoden) sind die Atmungskette (Sauerstoffaufnahme, NADH-Dehydrogenase, Oxidase und ATPase), Teile des TCA-Zyklus (Citratsynthase, Aconitase), die Phosphoenolpyruvatcarboxylase sowie die CO₂-Bildung. Die reversiblen Reaktionen der Glykolyse, welche die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-P (G3P) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) katalysieren, finden sich in 75 % aller EM wieder. Da PEP als Vorstufe für Oxaloacetat benötigt wird, kann dieser Metabolit alternativ nur unter ATP-Verbrauch aus Pyruvat über die Phosphoenolpyruvatsynthase (PPS, Abbildung 13g) generiert werden. Dadurch ergibt sich jedoch mit 1 (mol ATP)/(mol Itaconat) eine deutlich schlechtere Energiebilanz als unter Verwendung der Glykolyse. Beispielsweise werden über den *PTS-Weg* (Abbildung 12b) pro Molekül Itaconat 5 Moleküle ATP gebildet. Erfolgt die Phosphorylierung der Glucose erst nach der Aufnahme in die Zelle durch die Hexokinase (HEXOK), so reduziert sich die ATP-Produktion auf 4,66 (mol ATP)/(mol Itaconat) bei der Synthese von Pyruvat über die Pyruvatkinase (Abbildung 12c), auf 3,66 (mol ATP)/(mol Itaconat) bei der Synthese von Pyruvat über das Malatenzym (Abbildung 13e) und auf 2,66 (mol ATP)/(mol Itaconat) bei der Synthese von Pyruvat über den Methylglyoxal-Weg (Abbildung 12d).

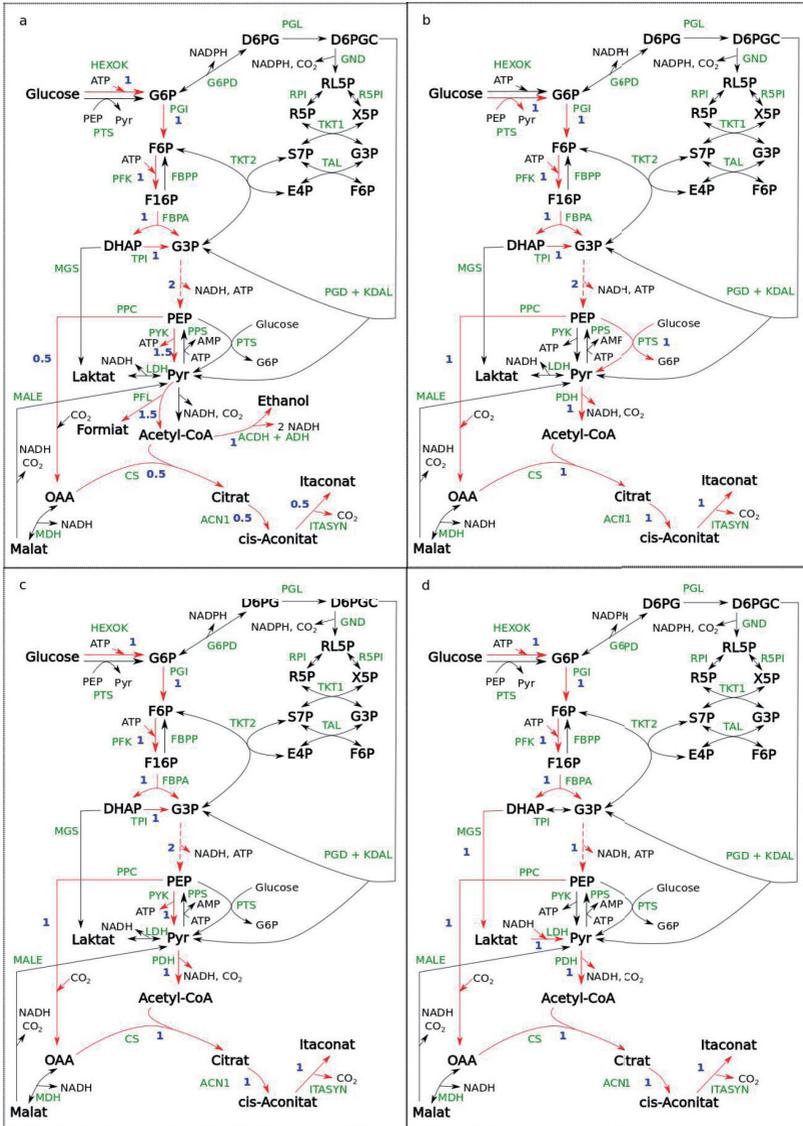


Abbildung 12: Ausgewählte (optimale) anaerobe und aerobe Stoffwechselwege von Glucose zum Itaconat: a) anaerobe Itaconatproduktion mit Ethanol als Nebenprodukt, b) aerober „PTS-Weg“ zum Itaconat, c) aerober „Hexokinase-Weg“, d) aerober „MGS-Weg“. Die beteiligten Reaktionen sind rot gekennzeichnet, die Flüsse sind in blauen Ziffern angegeben. Die Reaktionsnamen (grün) können Anhang entnommen werden.

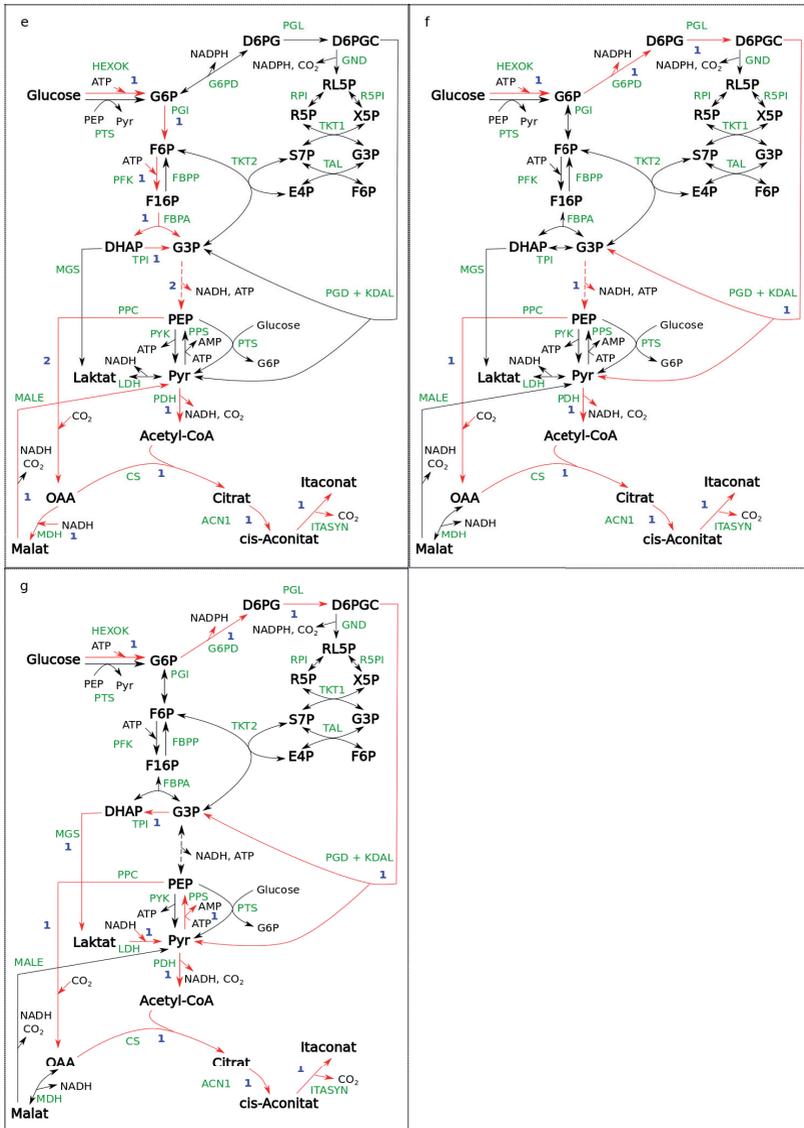


Abbildung 13: Fortsetzung Stoffwechselwege zum Itaconat: e) aerober „MDH-Weg“, f) aerober „EDD-Weg“, g) aerober „EDD-MGS-Weg“. Die beteiligten Reaktionen sind rot gekennzeichnet, die Flüsse sind in blauen Ziffern angegeben. Die Reaktionsnamen (grün) können dem Anhang entnommen werden.

Alternativ kann die Bereitstellung der C3-Vorstufen (PEP und Pyr) auch über den Entner-Doudoroff-Weg (PGD + KDAL) erfolgen, wobei PEP entweder über die Glykolyse oder, wie bereits erwähnt, durch die Phosphorylierung von Pyruvat entsteht (Abbildung 13f und g).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie die Itaconatausbeute das maximale Wachstum beeinflusst. Um die maximalen Wachstumsraten über FBA zu bestimmen mussten noch zusätzliche (Standard-) Nebenbedingungen berücksichtigt werden. So wurde eine maximale Glucoseaufnahmerate ($r_{\text{GLC}} \leq 10 \text{ mmol/g BTM/h}$) und eine minimale ATP-Bildungsrate, die für Maintenance-Prozesse benötigt wird ($r_{\text{ATP}_{\text{maint}}} \geq 8,39 \text{ mmol/g BTM/h}$) vorgegeben. Letztere dient der Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und nicht dem Wachstum der Zelle. Mittels FBA (siehe Grundlagen, Kapitel 2.3.1) wurde die maximale Itaconatausbeute unter diesen Bedingungen ermittelt, die weiterhin bei 1 mol/(mol Glucose) liegt. Desweiteren wurde die maximale Wachstumsrate über FBA bestimmt. Laut Modell kann *E. coli* unter den gegebenen Bedingungen aerob mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,88 \text{ h}^{-1}$ wachsen. Nach Division der Wachstumsrate durch die Glucoseaufnahmerate ergibt sich eine maximale Biomasseausbeute von $0,088 \text{ g BTM/(mmol Glucose)}$. Bei einer wachstumsgekoppelten Produktion mit maximaler Glucoseaufnahme und hoher Itaconatausbeute von z.B. $0,8 \text{ mol/(mol Glucose)}$ würde sich die Biomasseausbeute auf $0,026 \text{ g BTM/(mmol Glucose)}$ und die maximale Wachstumsrate auf $0,26 \text{ h}^{-1}$ reduzieren. Diese Abhängigkeiten lassen sich im Trade-off-Plot in Abbildung 14 darstellen.

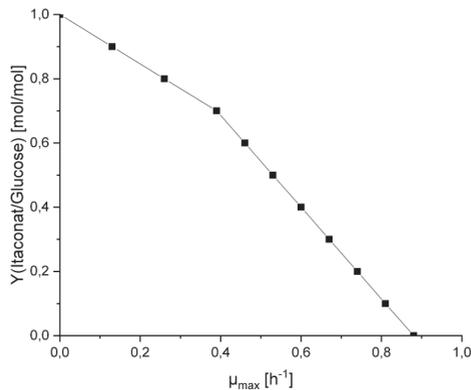


Abbildung 14: Maximale theoretisch erreichbare Wachstumsrate (μ_{max}) in Abhängigkeit von der Itaconatausbeute.

4.2. Einfluss der Itaconatkonzentration auf das Wachstum von MG1655

Um einen möglichst hohen Titer zu erzielen, ist eine gewisse Toleranz des Produktionsorganismus gegenüber dem Produkt erforderlich (Van Dien, 2013). Dieser Aspekt muss bei der Wahl eines geeigneten Produktionsstammes berücksichtigt werden. So zeigte sich beispielsweise *C. glutamicum* relativ tolerant gegenüber Itaconat, wohingegen bereits niedrige Itaconatkonzentrationen zu einer starken Hemmung des Wachstums von *A. niger* führten (Hossain et al., 2016; Otten et al., 2015).

Um den Einfluss der Itaconatkonzentration auf das Wachstum von *E. coli* zu untersuchen, wurde MOPS-Medium mit unterschiedlichen Itaconatkonzentrationen versetzt. Die Neutralisierung der Säure erfolgte entweder mit Natronlauge oder Ammoniak. Der finale pH-Wert war 7,1. Anschließend wurde in einer Schüttelkolbenkultivierung der Einfluss der Itaconatkonzentration auf das Wachstum des Wildtyps (MG1655) studiert. Es zeigte sich unabhängig von der verwendeten Lauge, dass Itaconat das Wachstum von *E. coli* beeinflusst (Tabelle 11). Bei einer extrazellulären Itaconatkonzentration von 22 g/l Itaconat reduziert sich die Wachstumsrate um 30-40 %. Bei einer Verdoppelung dieser Konzentration ist der Stamm immerhin noch in der Lage mit 30-40 % der ursprünglichen Wachstumsrate (bei 0 g/l Itaconat) zu wachsen. Nahezu kein Wachstum war bei 90 g/l Itaconat zu verzeichnen. Das veränderte Wachstum kann vermutlich sowohl auf chemischen Stress, als auch auf osmotischen Stress in Folge der hohen Natrium- bzw. Ammoniumkonzentration zur Neutralisierung der Säure zurückgeführt werden. Eine extrazelluläre Itaconatkonzentration von 29 g/l hat bereits weitreichende Änderungen der Genexpression zur Folge (Rau et al., 2016). So werden Gene der anaeroben Atmung und Gene für die Stressresistenz (z.B. Glutamatdecarboxylase und Antiporter) hochreguliert. Zudem deutete die erhöhte Expression eines Kaliumtransporters (*kdp*) auf osmotischen Stress hin (Rau et al., 2016). Die Autoren identifizierten über eine Transposon-Mutantenbibliothek mögliche Gene deren Inhibierung zu einer erhöhten Stresstoleranz führen könnte. Die für Itaconat getesteten Gene hatten jedoch einen negativen oder keinen Effekt auf das Wachstum. Eine Erhöhung der Toleranz gegenüber Itaconat könnte alternativ auch durch adaptive Evolution erfolgen.

Tabelle 11: Einfluss der Itaconatproduktion auf das Wachstum von MG1655 bei 30 °C. Dem MOPS-Medium wurde für die Kultivierung im Schüttelkolben die entsprechende Itaconatkonzentration hinzugefügt. Die Neutralisierung erfolgte entweder mit Natronlauge (NaOH) oder Ammoniak.

Itaconatkonzentration [g/l]	neutralisiert mit 10 M NaOH		neutralisiert mit 32 % Ammoniak	
	μ [1/h]	Reduktion	μ [1/h]	Reduktion
0	0,36	0	0,36	0
22	0,22	- 39 %	0,25	- 31 %
45	0,11	- 69 %	0,14	- 61 %
90	0,011	- 97 %	0,012	- 97 %

4.3. Implementierung des Itaconatsyntheseweges

Da *E. coli* die cis-Aconitat-Decarboxylase zur Synthese von Itaconat fehlt, muss dieses Enzym zunächst heterolog über ein Plasmid exprimiert werden. Um gleichzeitig den Fluss in den TCA-Zyklus zu deregulieren, wurde wie bei Vuoristo (Vuoristo et al., 2015a) die Citratsynthase (CS) aus *C. glutamicum* zusätzlich ins Gencluster integriert (Abbildung 15). Anders als in *E. coli* (Underwood et al., 2002) wird die CS in *C. glutamicum* nicht durch NADH allosterisch inhibiert (Eikmanns, 1994). Beide Gene wurden über das Order-Tool von *Life Technologies* (Thermo Fisher Scientific) für die Expression in *E. coli* codonoptimiert. Um eine stabile Expression zu ermöglichen wurden die Gene unter die Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors (BBa_J23100) gesetzt. Das Gencluster (BBa_J23100_cadA_gltA_BBa_0010) wurde anschließend von *Life Technologies* synthetisiert und in das Plasmid pMK_RQ integriert (Abbildung 10). Das so erhaltene Plasmid (pCadCs) wurde in den Wildtyp MG1655 transformiert. In einem initialen Test dieses ersten Produktionsstammes ita1 (MG1655 /pCadCs) in einer Schüttelkolbenkultivierung mit 9 g/l Glucose bei 30 °C und 37 °C konnte eine deutlich höhere Produktion bei 30 °C (1,5 mM statt 0,28 mM) beobachtet werden. Deshalb erfolgten die anschließenden Experimente immer bei 30 °C. Um die exponentielle Phase möglichst vollständig abzubilden, wurde die Glucosekonzentration für die weiteren Versuche auf 4 g/l reduziert.

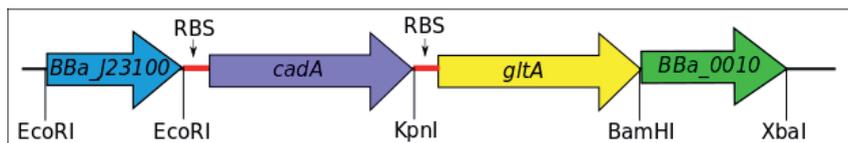


Abbildung 15: Itaconatsynthesecuster zur heterologen Produktion mit *E. coli*. Die Expression der codonoptimierten Gene *cadA* (*Aspergillus terreus*) und *gltA* (*Corynebacterium glutamicum*) erfolgte über den konstitutiven Promotor BBa_J23100 (parts.igem.org). Für die Translation wurden Ribosomenbindestellen (AGGAGGACAGCT) eingefügt. BBa_0010 ist ein Terminator (parts.igem.org). Das Synthesecuster wurde von Life Technologies synthetisiert und in das Plasmid pMK_RQ integriert, welches eine Kanamycinresistenz trägt.

Der Wildtyp wuchs bei 30 °C mit einer Wachstumsrate von $0,36 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und bildete $0,082 \pm 0,003 \text{ g BTM}/(\text{mmol Glucose})$ und Acetat mit einer Ausbeute von $0,34 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$. Dies ist weitestgehend konsistent mit dem stöchiometrischen Modell, welches für die ermittelte Glucoseaufnahme von $4,36 \text{ mmol/g BTM/h}$ und der gemessenen Acetatbildungsrate eine beinahe identische maximale Wachstumsrate von $0,32 \text{ h}^{-1}$ vorhersagt. Der Itaconatstamm ita1 zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein etwas verringertes Biomassewachstum mit einer Wachstumsrate von $0,30 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ und einer Biomasseausbeute von $0,074 \pm 0,001 \text{ g BTM}/(\text{mmol Glucose})$. In Zellextrakten von ita1 wurde eine Aktivität der cis-Aconitat-Decarboxylase von $0,5 \text{ U/mg Protein}$ sowie eine im Vergleich zum Wildtyp dreifach erhöhte Aktivität der

Citratsynthase (0,95 U/mg Protein) bestimmt. Itaconat wurde von ita1 kontinuierlich gebildet, wobei in der stationären Phase das zuvor exportierte Acetat als Substrat diente (Abbildung 16). Nach 26 h befanden sich $0,11 \pm 0,01$ g/l Itaconat im Kulturüberstand. Dies entspricht einer Itaconatausbeute von $0,04 \pm 0,00$ mol/(mol Glucose). Neben Acetat, welches in der exponentiellen Phase mit einer Ausbeute von $0,32 \pm 0,01$ mol/(mol Glucose) gebildet wurde, kam es auch zur Akkumulation von Glutamat (Ausbeute $0,10 \pm 0,01$ mol/(mol Glucose)). Die Abgabe von Glutamat ist wahrscheinlich Folge eines Ungleichgewichts zwischen dem Fluss in den TCA-Zyklus (über CS) und dem Fluss über die alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase (AKGDH). Die Aktivität der AKGDH in MG1655 ist relativ gering und korreliert negativ mit der Acetatbildung (Veit et al., 2007), dem Hauptprodukt von ita1.

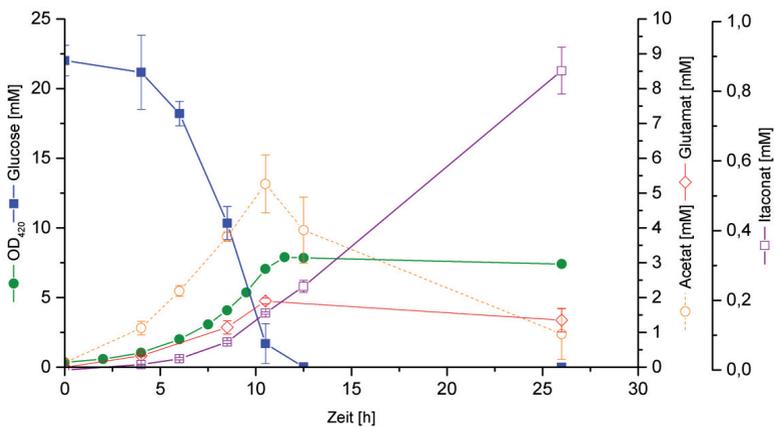


Abbildung 16: Kultivierung von *ita1* im Schüttelkolben bei 30 °C. Die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten ist durch die Fehlerbalken angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar eine kontinuierliche Itaconatproduktion in *ita1* vorhanden ist, jedoch die Überexpression der cis-Aconitat-Decarboxylase und der Citratsynthase nicht ausreichen, um den Hauptfluss zum Itaconat umzuleiten. In einem ähnlichen Ansatz von Vuoristo (Vuoristo et al., 2015a) wurden die Enzyme über einen starken induzierbaren Promotor exprimiert, was zur Bildung von Einschlusskörpern und einer stark beeinträchtigten Wachstumsrate führte. Der hier verfolgte Ansatz über die konstitutive Expression hingegen beeinträchtigte das Wachstum nur geringfügig und erzielte eine vergleichbare Ausbeute. Im nächsten Schritt sollte daher die Itaconatausbeute durch einen modellbasierten Ansatz erhöht werden.

4.4. Modellbasierte iterative Optimierung der Itaconatproduktion

Der TCA-Zyklus in *E. coli* stellt normalerweise die Reduktionsäquivalente für die Atmungskette bereit. Über die Atmungskette wird dann ATP für das Wachstum generiert. Für die Itaconatproduktion muss der TCA-Zyklus so verändert werden, dass er vorwiegend der Produktsynthese dient. Durch die Expression der Citratsynthase aus *C. glutamicum* (4.3) wurde bereits ein höherer Fluss in den TCA-Zyklus ermöglicht. Jedoch muss für eine effiziente Itaconatproduktion auch eine ausreichende Verfügbarkeit der CS-Precursor Acetyl-CoA und Oxalacetat gewährleistet werden (Abbildung 18). Die Herausforderung bestand nun darin die Flüsse so umzuleiten, dass die genannten Voraussetzungen für die Produktion erfüllt werden, gleichzeitig aber weiterhin ausreichend Vorstufen für die Biomassesynthese zur Verfügung stehen. Ziel war es daher die Produktbildung und das Wachstum aneinander zu koppeln (siehe Kapitel 2.3.2).

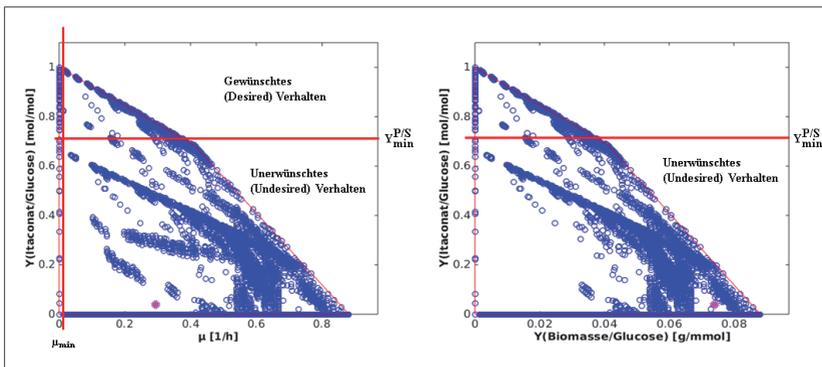


Abbildung 17: Trade-off-Diagramme für das initiale Modell (Itaconatausbeute vs. Wachstumsrate (links) bzw. vs. Biomasseausbeute (rechts)). Der Phänotyp vom ersten Itaconatproduktionsstamm *ita1* ist jeweils durch den pinken Punkt verdeutlicht. Die blauen Punkte stellen elementare Flussvektoren dar. Die für die Optimierung gewählten Grenzen für die Produktausbeute und die Wachstumsrate sind durch die roten Linien gekennzeichnet.

Der in Kapitel 4.2 beschriebene Phänotyp von *ita1* diente als Grundlage für das initiale Modell, welches zunächst neben der Bildung von Biomasse, CO_2 und Itaconat auch die Abgabe von Acetat ermöglichte (Abbildung 19). Da angenommen wurde, dass eine erhöhte Itaconatproduktion auch eine reduzierte Glutamatausbeute zur Folge hat, wurde die Abgabe von Glutamat zu diesem Zeitpunkt nicht im Modell berücksichtigt. Des Weiteren wurde die Glucoseaufnahmerate r_{GLC} auf 10 mmol/g BTM/h eingeschränkt und ein ATP-Bedarf für den Erhaltungsstoffwechsel ($r_{\text{ATP,maint}}$) von 8,39 mmol/g BTM/h vorgegeben. Somit ergeben sich 35511 Elementare Flussvektoren (EFV) zur Verstoffwechslung der Glucose. Die Verteilung der EFVs in den jeweiligen Trade-off-Diagrammen von Wachstumsrate zu Itaconatausbeute bzw. Biomasseausbeute zu Itaconatausbeute ist in Abbildung 17 dargestellt. Bezüglich der Biomasseausbeute befindet sich der Stamm *ita1* nahezu im optimalen Bereich. Die suboptimale Wachstumsrate von $0,29 \text{ h}^{-1}$ ist darauf zurückzuführen, dass mit $4,01 \text{ mmol/g BTM/h}$ eine geringere Glucoseaufnahmerate erreicht wurde als für die Berechnung der EFVs angenommen

wurde. Für diese Aufnahme rate ist auch laut Modell maximal eine Wachstumsrate von $0,33 \text{ h}^{-1}$ möglich.

Zur Identifizierung geeigneter Interventionsstrategien, die zu einer Kopplung von Biomasse- und Produktsynthese führen, wurde das Konzept der constrained Minimal Cut Sets (cMCS, siehe 2.3.2) gewählt. Die Berechnung der cMCS erfolgte nach von Kamp and Klamt (2014) über den dualen Ansatz, welcher im Gegensatz zur Elementarmoden-basierten Berechnung der cMCS auch die Berücksichtigung von Flussgrenzen (inhomogenen Nebenbedingungen) erlaubt. Zur Beschreibung des unerwünschten Verhaltens (Produktausbeute $Y_{\min}^{P/S} = 0,7 \text{ mol/mol}$) wurden folgende Ungleichung verwendet:

$$\frac{\Gamma_{\text{ITASYN}}}{\Gamma_{\text{GLC}}} \leq Y_{\min}^{P/S} \leftrightarrow \Gamma_{\text{ITASYN}} - Y_{\min}^{P/S} \Gamma_{\text{GLC}} \leq 0$$

Das gewünschte Verhalten, welches neben der Mindestausbeute auch eine minimale Wachstumsrate $\mu_{\min} = 0,01 \text{ h}^{-1}$ vorsah, wurde durch die folgenden Ungleichungen beschrieben:

$$Y_{\min}^{P/S} \Gamma_{\text{GLC}} - \Gamma_{\text{ITASYN}} \leq 0$$

$$-\mu \leq -\mu_{\min}$$

Die daraus resultierende Berechnung aller 945 cMCSs ergab, dass mindestens 5 Knockouts für eine Kopplung von Wachstum und Produktsynthese nötig sind. Ebenso zeigte sich, dass eine Unterbrechung des TCA-Zyklus (α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (AKGDH), Succinatdehydrogenase (SUCDH) oder Succinyl-CoA-Synthetase (SUCS)) in 95 % aller Cut Sets und eine Unterbrechung des Glyoxylatshunts (Isocitratlyase (ICL) oder Malatsynthase (MALS)) in 78 % aller Cut Sets vertreten sind und somit wesentliche Targets für eine verbesserte Itaconatproduktion darstellen (Abbildung A1).

Die kleinsten Cut Sets (5 Reaktionsdeletionen) unterbinden durch Inaktivierung der SUCDH sowohl den TCA- als auch den Glyoxylatzyklus. Da eine solche Mutante jedoch Succinat produziert (Lin et al., 2005), fiel die Wahl auf ein cMCS mit kombinierter Inaktivierung der ICL und SUCS (Abbildung 19). Das gewählte cMCS1 (6 Reaktionsdeletionen) beinhaltet zudem Reaktionen zur Unterbindung der Acetatproduktion (Pyruvatoxidase (POX) und Phosphotransacetylase (PTA)) und zur Blockade des Pentosephosphatweges (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)). Letzteres verhindert die zyklische Oxidation von Glucose zu CO_2 . Die genannten 5 Reaktionsdeletionen forcieren bereits die Produktion von Itaconat mit einer Mindestausbeute von $0,65 \text{ mol/(mol Glucose)}$. Die durch das Cut-Set vorgeschlagene zusätzliche Inaktivierung der Triosephosphatisomerase (TPI) splittet den Fluss vom F16P und zwingt einen Teil über den Methylglyoxylatweg (MGS). Dieses reduziert die ATP-Produktion und folglich das Biomassewachstum, und hebt die Mindestproduktausbeute wie gefordert über $0,7 \text{ mol/(mol Glucose)}$.

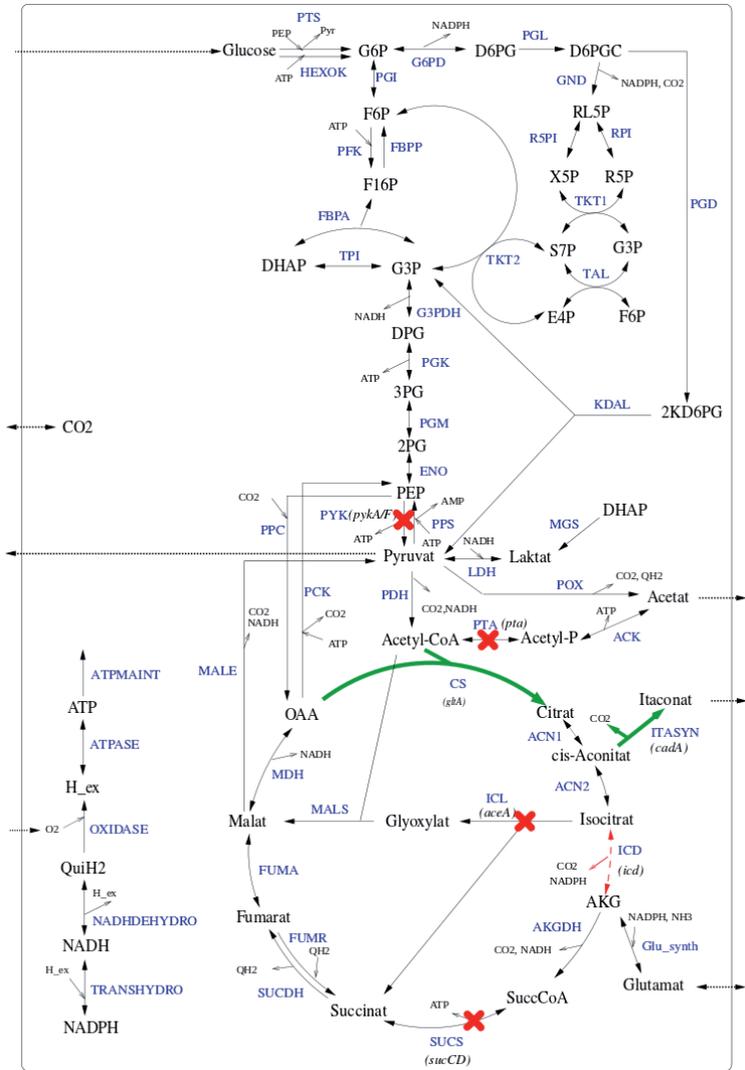


Abbildung 18: Zentrale Stoffwechselwege des stöchiometrischen Netzwerkmodells, welches für die Bestimmung der Knockout-Strategien verwendet wurde. Eine Auflistung aller Reaktionen kann dem Anhang (Tabelle A1) entnommen werden. Der Export von Pyruvat sowie die Aufnahme und Abgabe von Glutamat wurden erst im Verlauf der Stammkonstruktion dem Modell hinzugefügt. Neben den Reaktionsnamen (blau) sind für die veränderten Reaktionen zusätzlich die assoziierten Gene angegeben. Die grünen dicken Pfeile verdeutlichen ein Überexpression, der rote gestrichelte Pfeil eine abgeschwächte Expression des entsprechenden Gens. Die roten Kreuze stehen für Gendelektionen.

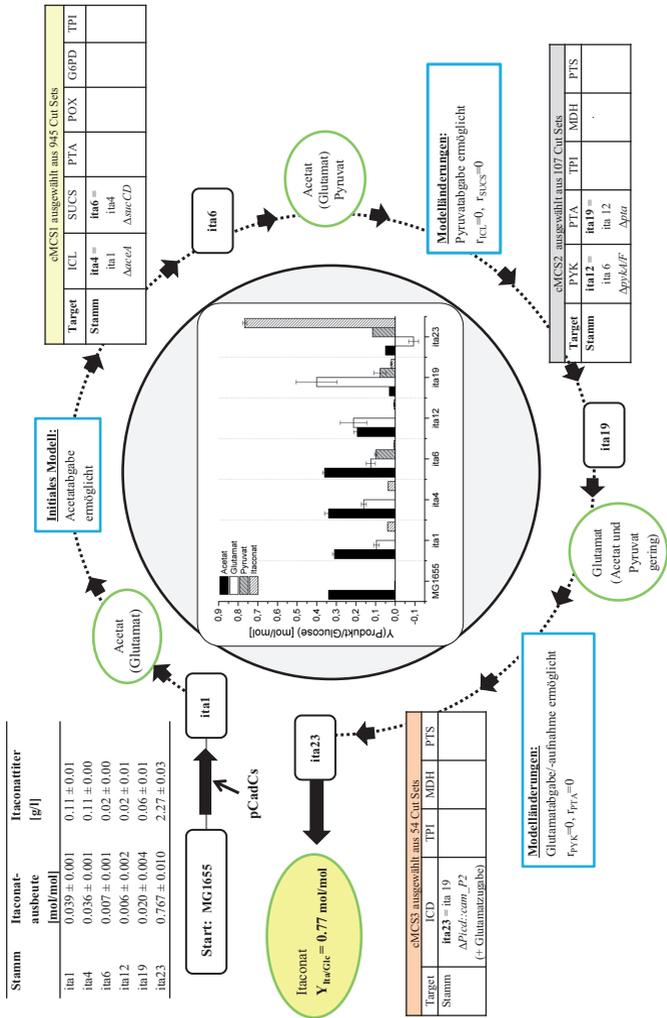


Abbildung 19: Iterative modellbasierte Konstruktion eines *E. coli*-Stammes für die Produktion von Iaconat mit hoher Ausbeute. Das Balkendiagramm in der Mitte zeigt die Produktausbeuten der konstruierten Stämme und für ita23 zusätzlich die Glutamataufnahme (negative Ausbeute). Die Iaconat-ausbeute wurde in der finalen Probe bestimmt, alle anderen Ausbeuten beziehen sich auf die exponentielle Phase. Über den äußeren Kreis ist das iterative Vorgehen gezeigt. Signifikante Änderungen der gebildeten Nebenprodukte (grüne Kreise) führten zu einer Anpassung des Modells (blaue Boxen) und somit zu einer Neuberechnung der Cut Sets.

4.4.1. Iteration 1 – TCA-Zyklus und Glyoxylatzyklus

Zunächst sollte der TCA-Zyklus und der Glyoxylatzyklus unterbrochen werden, da entsprechende Reaktionsdeletionen in mehr als 70% aller Cut Sets enthalten waren. Die kombinierte Unterbrechung des TCA-Zyklus (ICD) und des Glyoxylatshunts (ICL) hatte in einer Studie von Okamoto (Okamoto et al., 2014) keinen positiven Einfluss auf die Itaconatproduktion. Die Implementierung der ersten Knockouts (*aceA*, *sucCD*) des cMCS1 führte im resultierenden Stamm *ita6* zu einer vergleichsweise deutlichen Reduktion der Itaconatproduktion (Abbildung 19). Die Glutamatproduktion wurde durch die Unterbrechung des Glyoxylatshunts zunächst verstärkt, anschließend aber durch die Deletion der SUCS wieder reduziert. Durch den unterbrochenen TCA-Zyklus konnte in *ita6* ($\Delta aceA \Delta sucCD$) zudem ein erhöhter Überflussmetabolismus zu Acetat und Pyruvat beobachtet werden, was auf eine verstärkte Akkumulation von Acetyl-CoA hindeutet, begünstigt durch eine verringerte Verfügbarkeit von Oxalacetat. Das Biomassewachstum wurde durch die Interventionen hingegen nur geringfügig beeinflusst (Abbildung 20).

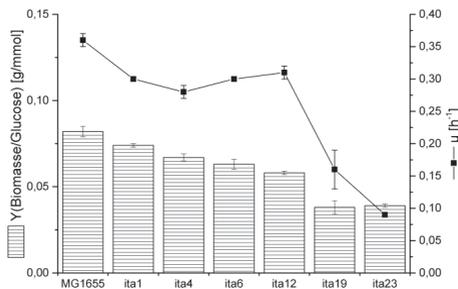


Abbildung 20: Biomasseausbeuten und Wachstumsraten der konstruierten Stämme

4.4.2. Iteration 2 – Teilung des Flusses am PEP/Pyruvat-Knoten

Um zu gewährleisten, dass durch die gewählte Interventionsstrategie auch die Pyruvatproduktion eingeschränkt wird, war eine Anpassung des Modells durch Hinzufügen einer Reaktion für den Export von Pyruvat (PYR_EX) erforderlich. Gleichzeitig wurden die Raten der bereits deletierten Reaktionen (ICL und SUCS) auf 0 gesetzt. Die Anzahl der möglichen Interventionsstrategien reduzierte sich dadurch auf 107 (Abbildung 19). Wie bereits in (4.3) erläutert, ist die Bereitstellung der Vorstufen Oxalacetat und Acetyl-CoA essentiell für eine effiziente Itaconatsynthese. Die extrazelluläre Anreicherung von Acetat deutete daraufhin, dass Oxalacetat der produktionslimitierende Metabolit ist. Üblicherweise erfolgt eine

Überexpression der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PPC) um den anaplerotischen Fluss zum Oxalacetat zu erhöhen (Park et al., 2013; Song et al., 2013). Die Strategien aller Cut Sets der 2. Iteration beinhalteten dagegen alternativ die Inaktivierung der Pyruvatkinase (PYK) (siehe Abbildung A2). Durch die PYK-Deletion wird die Verfügbarkeit von PEP und somit der Fluss durch die PPC erhöht. Das gewählte Cut Set cMCS2 (Abbildung 19) fordert zusätzlich die Inaktivierung des PTS-System (PTS), der Triosephosphatisomerase (TPI) und Malatdehydrogenase (MDH) um die Produktion von Pyruvat weiter einzuschränken. Die verbliebenen Stoffwechselwege zum Pyruvat, der *MGS-Weg* (Abbildung 12d) und der *EDD-Weg* (Abbildung 13f), teilen den Fluss somit in equimolare Mengen an Pyruvat und PEP. Da weiterhin die Biomassesynthese durch die verringerte ATP-Produktion eingeschränkt ist, verbleibt die Itaconatbiosynthese als einziger Weg um überschüssiges PEP abzuführen. Im Gegensatz zu cMCS1 muss bei cMCS2 nur der PTA-Weg zum Acetat unterbrochen werden. Die Deletion der Pyruvatoxidase ist nicht mehr nötig, da das Pyruvat bereits vorwiegend für die Synthese von Acetyl-CoA benötigt wird, um über die Itaconatsynthese den PEP-Pool ausgeglichen zu halten.

In einer früheren Studie wurde bereits in einer PYK-Mutante durch Markierungsexperimente ein erhöhter Fluss über die PPC nachgewiesen (Toya et al., 2010). Tatsächlich reduzierte sich in Stamm ita12 (*ita6 ΔpykA/F*) die Acetatproduktion. Pyruvat wurde nicht mehr produziert und sowohl Wachstum als allerdings auch Itaconatproduktion änderten sich kaum (Abbildung 19, Abbildung 20). Um die Acetatproduktion weiter zu verringern wurde im nächsten Schritt der Hauptsyntheseweg durch Deletion des *pta*-Gens inaktiviert. Durch die damit verbundene weiter erhöhte Verfügbarkeit von Acetyl-CoA verschob sich das Produktspektrum in Richtung TCA-Zyklus. Die Acetatproduktion reduzierte sich im konstruierten Stamm ita19 (*ita12 Δpta*) auf einen geringen Wert von 0,03 mol/(mol Glucose). Hingegen war eine verdoppelte Produktion von Itaconat und verdreifachte Produktion von Glutamat zu beobachten (Abbildung 19). Gleichzeitig führte die verstärkte Produktion zu einem deutlich verringerten Wachstum (Abbildung 20).

4.4.3. Iteration 3 – Blockierung der Glutamatsynthese

Durch die bisherigen Interventionen konnte zwar die Glutamatsynthese deutlich verbessert werden, die Synthese von Itaconat blieb jedoch gering. In der nächsten Iteration sollte daher die Produktion von Glutamat berücksichtigt werden. Zunächst wurde nur die Abgabe von Glutamat ($r_{\text{Glu}_{\text{t, Ex}}} \geq 0$) im Modell erlaubt. Glutamat ist jedoch essentiell für das Wachstum. Daher konnte kein cMCS gefunden werden, welches die Glutamatsynthese unterdrückt, gleichzeitig aber auch Wachstum ermöglicht. Als Konsequenz wurde die Aufnahme von Glutamat, d.h. eine negative Rate von $r_{\text{Glu}_{\text{t, Ex}}}$ im Modell erlaubt ($-\infty \leq r_{\text{Glu}_{\text{t, Ex}}} \leq +\infty$). Die Neuberechnung der cMCSs ergab, dass zusätzlich zu den weiteren KOs aus cMCS2 die Inaktivierung der Isocitratdehydrogenase (ICD) oder der Glutamatsynthese (*Glu_synth*) nötig

ist (Abbildung 19 und Abbildung A3). Für das Wachstum solcher glutamat-auxotropher Stämme ist dann eine Zugabe von externem Glutamat erforderlich. Alternativ zum Knockout besteht aber auch die Möglichkeit einer abgeschwächten Genexpression, um so eine Auxotrophie für Glutamat zu vermeiden. Um die *icd*-Expression in *ita19* abzuschwächen, wurde daher der natürliche Promotor gegen einen schwachen konstitutiven Promotor (BBa_J23115) ausgetauscht. Der konstruierte Stamm *ita23* zeigte eine stark reduzierte ICD-Aktivität von 0,006 U/mg Protein (*ita19*: 0,58U/mg Protein) und war damit ebenfalls auxotroph für Glutamat. Daher erfolgte die Kultivierung von *ita23* in MOPS-Medium mit 1,5 g/l Glutamat (Abbildung 21). Das von *ita23* aufgenommene Glutamat kann wegen des praktisch vollständig unterbrochenen TCA-Zyklus nur zum Aufbau von Biomasse und nicht zur Produktion von Itaconat verwendet werden. Insgesamt wurden durch *ita23* 0,29 g/l Glutamat aufgenommen (Abbildung 21).

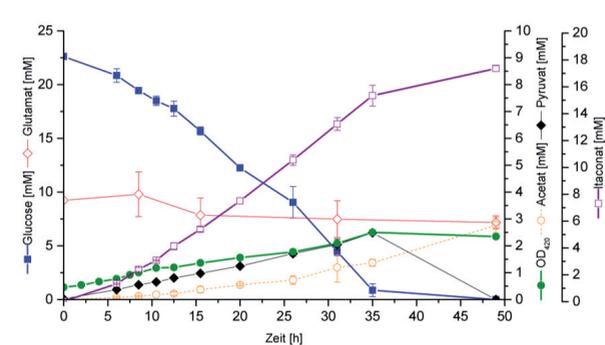


Abbildung 21: Kultivierung von *ita23* im Schüttelkolben bei 30 °C. Die Kultivierung erfolgte in MOPS-Medium mit 1,5 g/l Glutamat.

Ita23 wuchs zunächst mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,09 \text{ h}^{-1}$, welche sich in der zweiten Phase der Schüttelkolbenkultivierung (nach 10,5 h) auf $0,03 \text{ h}^{-1}$ reduzierte (Tabelle 12). Itaconat wurde in beiden Phasen mit einer hohen Ausbeute von $0,74 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$ gebildet. Die Produktivität in der zweiten Phase betrug $0,066 \text{ g}/\text{h}$ (berechnet für 11-35 h). Insgesamt führte die Schüttelkolbenkultivierung innerhalb von 49 h zur Produktion von $2,27 \text{ g}/\text{l}$ Itaconat mit einer ausgezeichneten Ausbeute von $0,77 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$. In kleineren Mengen wurden weiterhin Acetat und Pyruvat produziert, wobei letzteres in der stationären Phase wiederum als Substrat diente (Abbildung 21).

Bereits frühere Studien zeigten den positiven Effekt einer Inaktivierung oder Abschwächung der Isocitratdehydrogenase auf die Itaconatproduktion (Okamoto et al., 2014; Otten et al., 2015). Die Kultivierungsergebnisse mit *ita23* verdeutlichen auf eindrucksvolle Weise, dass eine ausreichende Verfügbarkeit von cis-Aconitat der Schlüssel zu einer hohen Produktion ist. Cis-Aconitat ist ein Zwischenprodukt der Aconitase, die es abhängig von der Orientierung im aktiven Zentrum zu Citrat oder Isocitrat umsetzt (Beinert et al., 1996). Da weder Citrat noch

Isocitrat durch ita23 exportiert werden, führt die Blockade der Isocitratdehydrogenase folglich zu einer Anreicherung von Isocitrat und somit zur verstärkten Bildung von cis-Aconitat und Itaconat.

Tabelle 12: Wachstumsverhalten von ita23 im Schüttelkolben. Die Ausbeuten für Phase 1 und 2 wurden im exponentiellen Bereich bestimmt. Die Gesamtausbeute bezieht sich auf die Itaconatkonzentration in der letzten Probe.

	Phase 1 (0-10,5h)	Phase 2 (10,5-35h)	Gesamt (0-48 h)
μ [h^{-1}]	$0,09 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$	
$Y_{\text{Itaconat}/\text{Glucose}}$ [mol/(mol Glucose)]	$0,74 \pm 0,06$	$0,74 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
r_{Glucose} [mmol/gBTM/h]	$2,51 \pm 0,24$	$1,88 \pm 0,07$	
r_{Itaconat} [mmol/gBTM/h]	$1,88 \pm 0,07$	$1,26 \pm 0,11$	
Titer [g/l]			$2,27 \pm 0,03$

Mit ita23 konnte bereits eine wachstumsgekoppelte Produktion von Itaconat über der geforderten Mindestausbeute von 0,7 mol/(mol Glucose) erzielt werden. Laut Modell sind Itaconatproduktion und Biomassesynthese jedoch noch nicht gekoppelt (Abbildung 22). Theoretisch wäre also weiterhin eine maximale Biomasseproduktion ohne Itaconatsynthese denkbar, was sich auch darin widerspiegelt, dass laut cMCS3 weitere Reaktionsdeletionen (TPI, MDH und PTS) theoretisch notwendig wären. Wird jedoch für den Knockoutstamm ita23 eine Wildtyp-ähnliche Verteilung der Flüsse unter den durch KOs gegebenen Einschränkungen erwartet, so tragen der Methylglyoxalweg und der Entner-Doudoroff-Weg nicht wesentlich zur Flussverteilung bei. Über den Pentosephosphatweg werden ca. 27 % der aufgenommenen Glucose umgesetzt (Chen et al., 2011). Durch die Expression der deregulierten Citratsynthase wird vermutlich das gebildete Oxalacetat vorwiegend für die Itaconatsynthese verwendet. Daher kann angenommen werden, dass die Malatdehydrogenase nur die Bildung von Oxalacetat katalysiert ($r_{\text{MDH}} \geq 0$). Unter diesen Annahmen wird bereits die Synthese von Itaconat mit einer Ausbeute von 0,51 mol/(mol Glucose) erzwungen. Wie beim Wildtyp erfolgt die Umsetzung dann vorwiegend über die Glykolyse, welche eine Aufteilung des Flusses am Knotenpunkt PEP in Oxalacetat (PPC) und Acetyl-CoA (über PTS und Pyruvatdehydrogenase (PDH)) erzwingt. Wird für das Modell die für ita23 experimentell bestimmte Glucoseaufnahmerate von 2,5 mmol/g BTM/h verwendet, so erhöht sich die minimale Ausbeute auf 0,72 mol/(mol Glucose) und ist somit nahezu identisch zu der in der exponentiellen Phase gemessenen Ausbeute.

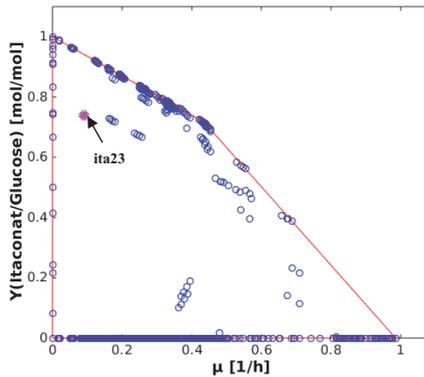


Abbildung 22: Ausbeutediagramm für das Modell nach Iteration 3. Die Abschwächung der *icd*-Expression wurde als Knockout betrachtet ($r_{iCD} = 0$). Die blauen Punkte repräsentieren die EFVs. Der rosa Punkt steht für die Endausbeuten an Biomasse und Itaconat, die mit der Schüttelkolbenkultivierung erzielt wurden.

4.4.4. Kultivierung von *ita23* im Bioreaktor

Im nächsten Schritt erfolgte ein up-scaling der Itaconatproduktion mit *ita23*. Das Startvolumen vergrößerte sich durch die Kultivierung im Bioreaktor von 50 ml auf 400 ml. Während der Fed-Batch-Kultivierung wurde der pH-Wert auf 7 und der Gelöstsauerstoff (DO) auf $\geq 30\%$ geregelt. Der Verlauf des pO_2 kann der Abbildung im Anhang (Abbildung A4) entnommen werden. Die Zugabe von Feed-Lösung erfolgte, wenn die Glucosekonzentration 10 g/l unterschritt. Kennzeichnend hierfür ist der sprunghafte Anstieg der Glucosekonzentration in Abbildung 23.

In der Batch-Phase wuchs *ita23* ähnlich wie im Schüttelkolben mit einer niedrigen Wachstumsrate von $0,07\text{ h}^{-1}$ (Tabelle 13). Die Itaconatausbeute reduzierte sich hier jedoch auf $0,54\text{ mol}/(\text{mol Glucose})$, ohne dass die Produktion anderer (bekannter) Nebenprodukte erhöht war (Abbildung 24). Nach 42 h, zum Ende der Batch-Phase, befanden sich 9 g/l Itaconat im Überstand (Abbildung 23). In der anschließenden Feed-Phase wuchs der Stamm noch 28 h mit einer Wachstumsrate von $0,02\text{ h}^{-1}$. Nach dem letzten Feed (79 h) war dann nahezu kein Wachstum mehr zu beobachten. Dadurch verringerte sich die Biomasseproduktion deutlich (Abbildung 24). Gleichzeitig erhöhte sich die Itaconatausbeute auf $0,71\text{ mol}/(\text{mol Glucose})$, was 71% der maximalen Ausbeute entspricht. Im Gegensatz zur batch-Phase konnte für die Feeding-Phase die Kohlenstoffbilanz geschlossen werden. Der Kohlenstoffanteil des Itaconats erreichte dabei mit 60% den gleichen Wert wie bei der Schüttelkolbenkultivierung (Abbildung 24).

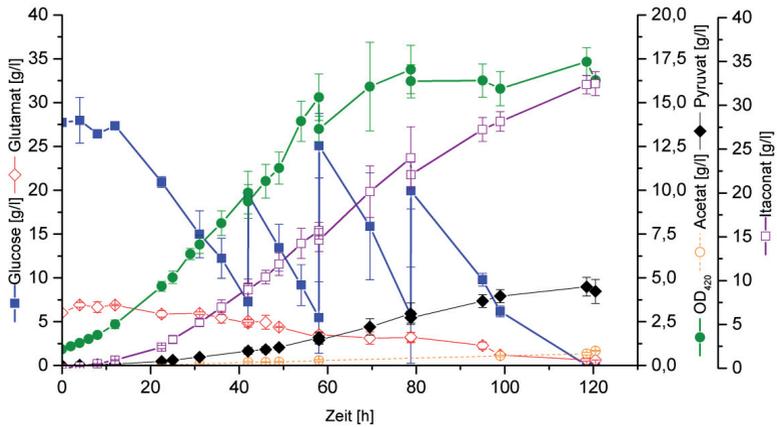


Abbildung 23: Fed-batch Kultivierung von ita23 im 1L-Fermenter bei 30 °C. Glucose und Glutamat wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten hinzugefügt: 42, 58 und 79 h.

Tabelle 13: Ausbeuten und Raten für die Kultivierung von ita23 im Bioreaktor.

	Batch-Phase	Feeding-Phase	Gesamt
μ [h ⁻¹]	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00	
Y_{Itaconat} [mol/(mol Glucose)]	0,54 ± 0,00	0,71 ± 0,07	0,68 ± 0,04
r_{Glucose} [mmol/gBTM/h]	3,13 ± 0,42	1,39 ± 0,34	
r_{Itaconat} [mmol/gBTM/h]	1,72 ± 0,14	1,05 ± 0,35	
q_{Itaconat} [g Itaconat/l/h] (volumetrische Produktivität)	0,22 ± 0,03	0,38 ± 0,04 (max: 0,45 ± 0,11)	0,27 ± 0,01
Titer [g/l]			32 ± 1

Insgesamt zeigte ita23 im Bioreaktor eine sehr gute Performance. Es wurden innerhalb von 120 Stunden 32 g/l Itaconat mit einer Ausbeute von 0,68 mol/(mol Glucose) produziert. Die Produktivität in der Feed-Phase, welche im Mittel 0,38 g Itaconat/l/h betrug, erreichte nach dem zweiten Feed (58-79 h) ein Maximum von 0,45 g Itaconat/l/h. Die Nebenprodukte Pyruvat und Acetat wurden nur in geringen Mengen (≤ 5 g/l) gebildet.

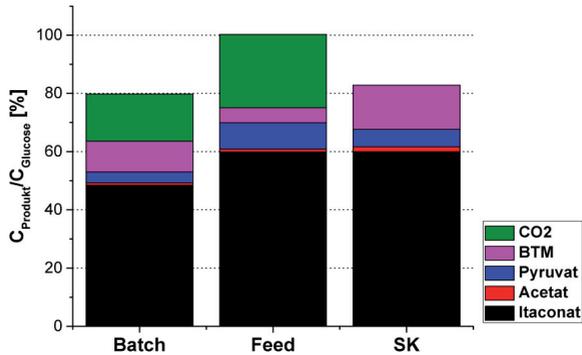


Abbildung 24: Kohlenstoffbilanz bezogen auf Glucose für die Batch- und Feedphase der Bioreaktorkultivierung sowie für die Schüttelkolbenkultivierung (SK). BTM = Biotrockenmasse. Die Bildung von CO₂ im Schüttelkolben wurde nicht bestimmt.

4.4.5. Zusammenfassung

Die Expression eines heterologen Proteins, der cis-Aconitat-Decarboxylase (CAD), ermöglicht die Produktion von Itaconat in *E. coli*. Um die Verwendung eines teuren Induktors zu vermeiden und um eine stabile Expression zu ermöglichen, erfolgte in dieser Arbeit die Expression der CAD über einen starken konstitutiven Promotor. Zusätzlich wurde eine verringerte Regulation des Flusses in den TCA-Zyklus durch die gleichzeitige Expression der Citratsynthase aus *C. glutamicum* erzielt. Diese wird anders als die native CS nicht durch NADH inhibiert. Die Expression dieser essentiellen Reaktionen der Itaconatbiosynthese führte zur Produktion von Itaconat mit einer Ausbeute von 0,04 mol/(mol Glucose) in ita1 (MG1655 /pCadCs). Die Ausbeute war jedoch nicht annähernd so hoch wie im natürlichen Produzenten *A. terreus* (siehe Tabelle 1), und weit unter der theoretischen maximalen Ausbeute von 1 mol/(mol Glucose). Um die Ausbeute zu erhöhen wurde daher ein modellbasierter iterativer Ansatz verfolgt, der für jede Iteration 3 Schritte vorsah. Im ersten Schritt wurde das zugrundeliegende Modell definiert bzw. modifiziert. Wurde in der vorhergehenden Iteration eine Veränderung der Nebenproduktbildung beobachtet, so wurde das Modell entsprechend erweitert. So wurden in der 2. Iteration die Produktion von Pyruvat und in der 3. Iteration die Aufnahme und Abgabe von Glutamat ermöglicht. Zudem wurden bereits deletierte Reaktionen auch im Modell inaktiviert. Im nächsten Schritt einer jeden Iteration erfolgte die Berechnung von Knockout-Strategien (cMCSs) welche Wachstum- und Produktsynthese obligatorisch koppeln. Anschließend erfolgte die iterative Entfernung einzelner Reaktionen des gewählten Cut Sets. Hierfür wurden die entsprechenden Gene aus dem Chromosom von *E. coli* entfernt. Zu Beginn besteht meist eine große Variabilität hinsichtlich der möglichen Cut Set Strategien. Durch die Implementierung von Knockouts (KOs), die in vielen Cut Sets enthalten sind, wird

eine hohe Flexibilität bezüglich der folgenden KOs gewahrt. Somit ist eine starre Festlegung auf ein bestimmtes Cut Set nicht zwangsläufig erforderlich. Ist der resultierende Phänotyp einzelner KOs bekannt, so kann dieser zur Entscheidungsfindung herangezogen werden. In der ersten Iteration dieser Studie wurde beispielsweise SUCS anstelle von AKGDH oder SUCDH gewählt, da die KOs bekanntermaßen zur Auxotrophie für Succinat oder zur Produktion dieses Metaboliten führen. Leicht ersichtliche KO-Targets sind essentielle KOs (hier: PYK in Iteration 2) und KOs zu den Nebenprodukten (hier: Acetat in Iteration 2 und Glutamat in Iteration 3). Eine signifikante Veränderung der Nebenproduktbildung markierte dann das Ende einer Iteration und den Beginn eines neuen Iterationsschrittes. Dieses zielgerichtete Vorgehen ermöglichte die Konstruktion eines Itaconatproduktionsstammes mit geforderter hoher Ausbeute. Hierfür waren drei Iterationen mit 1-2 KOs nötig. Der konstruierte Stamm ita23 ($\Delta aceA \Delta sucCD \Delta pykA \Delta pykF \Delta pta \Delta Picd::cam_P2 /pCadCs$) zeigte eine wachstumsgekoppelte Produktion von Itaconat mit einer hervorragenden Gesamtausbeute von 0,77 mol/(mol Glucose) im Schüttelkolben und 0,68 mol/(mol Glucose) im Bioreaktor (Fed-Batch). Die Fed-Batch-Kultivierung führte zur Produktion von 32 g/l Itaconat mit einer Gesamtproduktivität von 0,27 g/l/h.

Die *in vivo* gesehene Wachstumskopplung ist im Modell noch nicht gegeben, da laut Modell und MCS-Analyse weitere Deletionen nötig wären. Das deutet darauf hin, dass entweder noch keine obligatorische Kopplung vorliegt, oder dass Reaktionen, welche im Modell keinen Einschränkungen außer der Reversibilität unterliegen, in der Realität Flussgrenzen aufweisen und somit den realen Lösungsraum einschränken. In Abschnitt 4.5 soll daher untersucht werden, wie stringent die Kopplung von Wachstum und Produktsynthese tatsächlich ist.

4.5. Untersuchung der Wachstumskopplung der Itaconatproduktion

Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, erfolgte keine vollständige Implementierung eines Cut Sets, weshalb laut Modell noch keine obligatorische Kopplung von Biomasse- und Produktsynthese zu erwarten ist. Eine starke Kopplung bedeutet, dass der Stamm unabhängig von der Wachstumsrate immer eine geforderte Mindestausbeute liefert. Dies ermöglicht eine anschließende Optimierung des Wachstums über adaptive Evolution ohne Verlust der optimalen Produktionseigenschaften. Um die Stärke der Wachstumskopplung von ita23 zu untersuchen wurde eine Adaption durch serielle Verdünnung durchgeführt. Laut Ausbeutediagramm von ita23 (Abbildung 22) existieren zudem Lösungen ohne Itaconatproduktion, weshalb zusätzlich der KO-Stamm ohne Plasmid (BJH30) charakterisiert und adaptiert wurde (4.5.1). Basierend auf den resultierenden Ergebnissen wurden die Cut Sets neu berechnet und ein nächster KO implementiert (4.5.2). Der Effekt auf die Kopplung der Produktion wurde wiederum durch adaptive Evolution untersucht.

4.5.1. Untersuchung der Kopplung in ita23

Die Adaption von Stamm ita23 erfolgte durch serielle Verdünnung mit MOPS-Medium bei gleichbleibenden Kultivierungsbedingungen. Die Wachstumsrate wurde dabei über zwei Messpunkte abgeschätzt. Bereits nach 20 Generationen hatte sich die Wachstumsrate von ita23 verdoppelt (Abbildung 25). Da über die folgenden 20 Generationen keine Änderung der Wachstumsrate beobachtet werden konnte, wurde der Adaptionsansatz nach 9 Verdünnungen beendet.

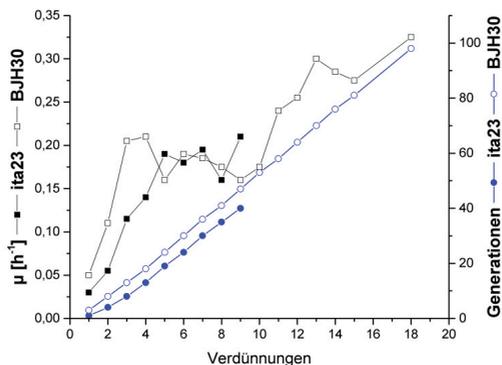


Abbildung 25: Adaptive Evolution von ita23 und BJH30. Die Wachstumsraten wurden über zwei Datenpunkte abgeschätzt. Das Animpfen der ersten Minimalkultur mit einem entsprechenden Volumen der LB-Vorkultur wurde nicht als Verdünnung betrachtet.

Nach 4 Verdünnungen (Tag 7, 13 Generationen) wurden einzelne Klone aus zwei unabhängigen Adaptionsansätzen (5.1 bzw. 5.2) isoliert. Die adaptierten Stämme von ita23 wuchsen mit einer Rate von 0,17 h⁻¹ bzw. 0,22 h⁻¹ (Tabelle 14). Die Glucoseaufnahmerate der adaptierten Stämme war fast identisch zur Rate des Wildtyps bei 30 °C (4,36 mmol/g BTM/h). Diese ist deutlich niedriger als die ursprünglich fürs Modell angenommene Aufnahmerate von 10 mmol/g BTM/h, welche bei einer Temperatur von 37 °C erreicht werden kann. Zur Darstellung der adaptierten Stämme im Ausbeutediagramm wurde die maximale Aufnahmerate im Modell daher auf 5 mmol/g BTM/h gesenkt. Abbildung 26 zeigt das Trade-off-Diagramm von Wachstumsrate und Itaconatausbeute in der exponentiellen Phase für den theoretischen Lösungsraum sowie für die untersuchten Stämme. Die verbesserte Wachstumsrate führte bei den adaptierten ita23-Stämmen gleichzeitig auch zu einer erhöhten Biomasseausbeute bei verringerter Itaconatproduktion (< 0,7 mol/(mol Glucose)), die jedoch immer mindestens 0,5 mol/(mol Glucose) betrug. Die Bildung der Nebenprodukte Pyruvat und Acetat änderte sich hingegen kaum (Tabelle 14). Die Genome zweier adaptierten Stämme (ita23 5.1 K8 und ita23 5.2 K7) wurden anschließend sequenziert. Im Vergleich zum Ursprungstamm BJH30 konnte jedoch nur in ita23 5.2 K7 eine zusätzliche Mutation identifiziert werden. Diese führt zu einem

Aminosäureaustausch an Position 104 des Transkriptionsterminators Rho (Abbildung 27). Der Proteinabschnitt hat laut UniProt jedoch keine Funktion, weshalb es fraglich ist, ob diese Mutation tatsächlich für das verbesserte Wachstum verantwortlich ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass das verbesserte Wachstum auf eine veränderte Genexpression zurückzuführen ist. Diese wird vermutlich epigenetisch weitergegeben. Bereits zu Beginn einer adaptiven Evolution können weitreichende Änderungen der Genexpression erfolgen (Ibarra et al., 2002). Um mögliche Genexpressionsunterschiede zu identifizieren könnte eine Sequenzierung der RNA des Ausgangsstammes und des adaptierten Stammes durchgeführt werden. Möglicherweise ist das Wachstum auf einen veränderten Glutamatstoffwechsel zurückzuführen. So konnte der Stamm ita19 ohne Unterbrechung des TCA-Zyklus an der Stelle der ICD noch mit einer Wachstumsrate von $0,16 \text{ h}^{-1}$ wachsen.

Tabelle 14: Adaption von ita23 mit und ohne Plasmid (BJH30). Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Raten und Ausbeuten auf die exponentielle (expo.) Wachstumsphase bei maximaler Wachstumsrate. Die Ergebnisse von ita23 stammen von drei, die von BJH30 von zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte aller anderen Stämme basieren auf einem Replikat. * Da die Phase mit maximaler Wachstumsrate von $0,09$ zu kurz war (6 h), wurde hier auch die folgende Wachstumsphase mit niedrigerer Wachstumsrate ($0,04$) berücksichtigt (6-50).

Stamm	$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$	r_{GLC} [mmol/ gBTM/h]	$Y_{(\text{BTM}/\text{Glc})}$ [g/mmol] expo./gesamt	$Y_{(\text{Itaconat}/\text{Glc})}$ [mol/mol] expo./gesamt	$Y_{(\text{Citrat}+\text{cis-}$ $\text{Aconitat}/\text{Glc})}$ [mol/mol]	$Y_{(\text{Pyruvat}/\text{Glc})}$ [mol/mol]	$Y_{(\text{Acetat}/\text{Glc})}$ [mol/mol]
ita23	0,10	2,51	0,035 / 0,020	0,74 / 0,77	0	0,16	0,05
ita23 5.1 K2	0,17	4,29	0,040 / 0,030	0,51 / 0,65	0	0,20	0,06
ita23 5.1 K8	0,17	4,53	0,038 / 0,033	0,52 / 0,63	0	0,09	0,05
ita23 5.2 K3	0,22	4,59	0,048 / 0,045	0,51 / 0,61	0	0,19	0,07
ita23 5.2 K7	0,21	4,38	0,048 / 0,044	0,50 / 0,60	0	0,15	0,07
BJH30	0,09	1,47	0,061*	0	0,16*	0	0,24*
BJH30 7.1 K1	0,24	4,82	0,050 / 0,052	0	0	1,11	0,08
BJH30 7.2 K1	0,21	4,57	0,046 / 0,050	0	0	1,07	0,09

Untersuchung der Adaption des Stammes BJH30

In (4.3.3) wurden Flusseinschränkungen beschrieben, welche für ita23 bereits eine Kopplung mit einer Mindestausbeute von $0,51 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$ voraussagen. Diese entspricht der Ausbeute der adaptierten Stämme in der exponentiellen Phase. Treffen die genannten Einschränkungen zu, so dürfte ohne Plasmid, also ohne Itaconatbiosynthese eigentlich kein Wachstum möglich sein. Um dies zu überprüfen, wurde der entsprechende Stamm BJH30 (ita23 – pCadCs) unter identischen Bedingungen wie ita23 kultiviert. Der Stamm war in der Lage zu wachsen und erreichte eine identische maximale Wachstumsrate ($0,09 \text{ h}^{-1}$), welche sich aber

bereits nach 6 h auf $0,04 \text{ h}^{-1}$ reduzierte (Tabelle 14). Durch eine deutlich reduzierte Glucoseaufnahmerate verdreifachte sich die Biomasseausbeute im Vergleich zu ita23. Die Ausbeute der Itaconatvorstufen cis-Aconitat und Citrat war mit $0,16 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$ jedoch gering. Aufgrund des geringen TCA-Zyklus-Flusses kommt es vermutlich zur Akkumulation von PEP und somit zur Inhibierung der Glykolyse. Angriffspunkt für eine allosterische Regulation durch PEP ist die 6-Phosphofruktokinase (Blangy et al., 1968). Durch die Inaktivierung dieser wird die obere Glykolyse blockiert und ein vermutlich hoher Fluss über den Pentosephosphatweg erzwungen. Dies ist konsistent mit dem Modell, welches für den gegebenen Phänotyp einen hohen Fluss über den Pentosephosphatweg voraussetzt (Tabelle A5).

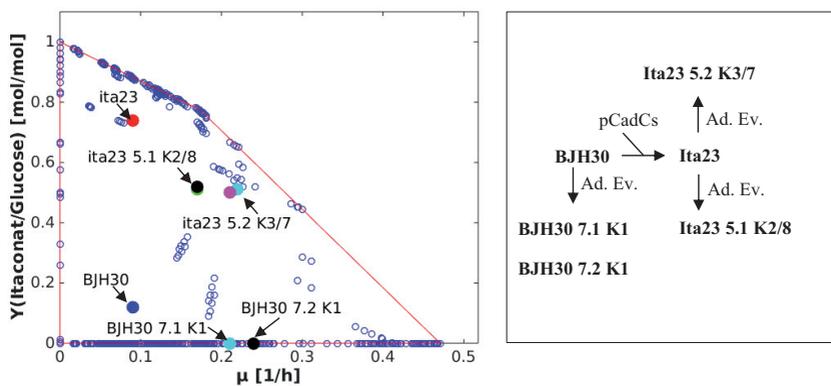


Abbildung 26: Trade-off-Diagramm für Wachstumsrate und Itaconatausbeute in der exponentiellen Wachstumsphase (links). Die großen bunten Punkte markieren den Phänotyp der verschiedenen Stämme. BJH30 hat die gleichen KOs wie ita23, enthält aber nicht das Plasmid pCadCs und kann daher kein Itaconat produzieren. Citrat und cis-Aconitat wurden als äquivalent zu Itaconat betrachtet (direkte Vorstufen von Itaconat), weshalb deren Ausbeute von BJH30 hier als Itaconatausbeute aufgetragen wurde. Die kleinen blauen offenen Punkte entsprechen den verbliebenen 1330 elementaren Flussvektoren des Stoffwechselmodells. Auf der rechten Seite ist der Verlauf der Stammentwicklung ausgehend vom KO-Stamm BJH30 aufgezeigt.

Durch Adaption von BJH30 konnte die Wachstumsrate wie schon bei ita23 nach ca. 20 Generationen verdoppelt werden. Stämme, welche nach 6 Verdünnungen (Tag 9, 30 Generationen) isoliert wurden, wuchsen mit Wachstumsraten von $0,21\text{-}0,24 \text{ h}^{-1}$ (Tabelle 14). Die Biomasseausbeute verringerte sich im Vergleich zum Ausgangsstamm. Interessanterweise fanden sich weder Citrat noch cis-Aconitat im Überstand. Stattdessen wurde 50 % der Glucose in der exponentiellen Phase in Pyruvat umgesetzt. Das Modell setzt für den ermittelten Phänotyp wieder einen hohen Fluss über den Pentosephosphatweg (mind. 56 % der Glucose (Tabelle A5)) voraus. Für die beobachtete Pyruvatproduktion muss zudem laut Modell entweder der Methylglyoxalshunt oder das Malatenzym aktiv sein. Um die Ursache für das verbesserte Wachstumsverhalten zu ergründen, wurden die adaptierten Stämme und der Ausgangsstamm BJH30 sequenziert. Überraschenderweise fanden sich im Genom von BJH30_7.2 K1 keine genetischen Veränderungen im Vergleich zu BJH30. Das verbesserte

Wachstum muss daher eine regulatorische Ursache haben. Der Klon BJH30_7.1 K1 hingegen hatte eine zusätzliche Mutation in der Citratsynthase (Tabelle A3 im Anhang). Diese führt zum Austausch eines Cysteins an Position 207 gegen ein Stop-Codon und somit zur Inaktivierung der Citratsynthase. Tatsächlich konnte in beiden adaptierten Stämmen keine nennenswerte Aktivität der Citratsynthase gemessen werden (0,002 U/mg Protein). Überschüssiges Oxalacetat wird somit vermutlich über die Malatdehydrogenase (MDH) und das Malatenzym (MALE) in Pyruvat umgewandelt, womit eine Nettokonvertierung von PEP zu Pyruvat ohne Pyruvatkinase möglich ist.

Durch weitere Adaption konnte mit BJH30 auch wieder die Wildtypwachstumsrate erreicht werden (Abbildung 25). Eine Charakterisierung dieser Stämme könnte vielleicht weitere Aufschlüsse über die Flussverteilung bringen, welche im KO-Stamm optimales Wachstum ermöglicht.

4.5.2. Untersuchung der Kopplung in *ita23 Δmdh*

Die Adaptionsergebnisse hatten gezeigt, dass die Produktion in *ita23* offensichtlich noch nicht obligatorisch gekoppelt ist. Daher sollte über eine weitere Iteration die Kopplung verstärkt werden. Hierfür wurden Cut Sets ausgehend von *ita23* mit einer angepassten maximalen Glucoseaufnahme von 5 mmol/g BTM/h berechnet. Neben dem gewählten cMCS3 wurden zusätzlich 4 weitere Cut Sets der Größe 3 gefunden (Tabelle 15). Diese enthalten neben dem KO der MDH zusätzlich eine Inaktivierung des Methylglyoxalshunts oder der Laktatsynthese (MGS oder LDH), sowie eine Unterbrechung des oxidativen Teils des Pentosephosphatweges (G6PD oder PGL). Da die Unterbrechung der anaplerotischen Produktion von Pyruvat (KO von MDH oder MALE) in allen Cut Sets enthalten war, wurde als nächstes die Malatdehydrogenase ausgeschaltet. Die Anzahl der EFVs reduziert sich dadurch von 1330 auf 668. Der konstruierte KO-Stamm BJH75 (MG1655 $\Delta aceA \Delta sucCD \Delta pykA \Delta pykF \Delta pta \Delta Picd::cam_P2 \Delta mdh$) war jedoch nicht in der Lage auf Minimalmedium zu wachsen. Gleiches galt für die Variante mit pCadCs (*ita41*). Dies war erstaunlich, da laut Modell durch den *mdh*-KO keine signifikanten Einschränkungen des Wachstums zu erwarten waren (Abbildung 27). Die Sequenzierung des Genoms von *ita41* ergab, dass ein größerer Genomabschnitt, welcher auch die Prolinbiosynthesegene enthält, bei Wachstum auf Komplexmedium deletiert wurde (Tabelle A4). Solch ein Stamm ist folglich auxotroph für Prolin und kann daher nicht auf Minimalmedium wachsen. Um wieder Wachstum zu ermöglichen erfolgte zunächst eine Adaption von *ita41* bei 30 und 37 °C unter Zugabe von LB₀. Die anfängliche Konzentration von 4 % LB₀ (v/v) wurde im Laufe der Adaption auf 1 % reduziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Adaption wurden Aliquots auf TN-Platten (Minimalmedium) ausgestrichen. In den Adaptionsansätzen konnte keine signifikante Verbesserung des Wachstums beobachtet werden. Die Stämme schienen nur so lange zu wachsen wie Komplexbestandteile (und somit Prolin) verfügbar waren (Abbildung A6 und Abbildung A7).

Dennoch konnten aus dem Ansatz 2 bei 37 °C Klone isoliert werden, welche auf Minimalmedium wuchsen. Zwei dieser Klone (ita46 und ita47) wurden daraufhin in Minimalmedium ohne LB₀ adaptiert. Während in der ersten Woche kaum Wachstum zu beobachten war, stieg die optische Dichte nach den folgenden 1-2 Verdünnungen sprunghaft an (Abbildung A8). Nach 8 Tagen (4-9 Generationen) wurden dann zwei Klone ita51 und ita52 aus der Adaption von ita46 und ita47 isoliert und in einer Schüttelkolbenkultivierung charakterisiert. Beide Stämme wuchsen nahezu identisch mit einer Wachstumsrate von 0,17-0,18 h⁻¹ und einer Biomasseausbeute von 0,044-0,047 g BTM/mmol (Tabelle 16). Die Ausbeute von Itaconat bzw. der Itaconatvorstufen cis-Aconitat und Citrat war jedoch mit 0,51 mol/(mol Glucose) niedriger als die Gesamtausbeute der adaptierten Stämme von ita23. Dies ist vermutlich auf die Inaktivierung der nativen Citratsynthase zurückzuführen (teilweise Deletion des *gltA* Gens (Tabelle A4)). Anders als bei den bisherigen Itaconatstämmen wurde auch Citrat ins Medium abgegeben. Zudem war die Ausbeute der Itaconatvorstufen höher als die Ausbeute von Itaconat (Tabelle 16). Im Stamm ita52 fanden sich zudem Mutationen, die die Synthese von Prolin wiederherstellen. Der alternative Syntheseweg beinhaltet Reaktionen der Argininbiosynthese. Der Abbau der Argininvorstufe N-Acetyl-L-Glutamat-5-semialdehyd zu N-Acetyl-ornithine wird durch die Deletion von *argD* unterbunden (Tabelle A4). Der Metabolit kann daher durch Acetylornithin-Deacetylase (*argE*) zu L-Glutamat-5-semialdehyd umgesetzt werden, einer Vorstufe von Prolin (Berg and Rossi, 1974). Gleichzeitig enthält der Stamm eine Mutation im Regulator der Argininbiosynthese (ArgR), welcher auch die Expression von *argE* reguliert. Durch diese Mutation kann weder Arginin an den Repressor, noch dieser an die DNA binden (UniProt, 2017a), wodurch die regulatorische Funktion verloren geht. Auch wenn zwei weitere Mutationen in ita52 in den Genen *asmA* (Membranassembly) und *polA* (DNA Polymerase) vorlagen, kann angenommen werden, dass das verbesserte Wachstum größtenteils auf die Mutationen der Argininbiosynthese zurückzuführen ist. Generell ließe sich das Auftreten von Auxotrophien im Voraus durch die Verwendung von Minimalplatten zur Selektion vermeiden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Sequenzierergebnisse erst nach Abschluss der Adaptionsexperimente vorlagen. Eine erneute Stammkonstruktion wäre bei Erfolg schneller gewesen als die hier verfolgte Adaption des auxotrophen Stammes.

Tabelle 15: Berechnete Cut Sets (cMCS) aus Iteration 4.

cMCS	Target		
3	TPI	MDH	PTS
A	G6PD	MDH	LDH
B	G6PD	MDH	MGS
C	PGL	MDH	LDH
D	PGL	MDH	MGS

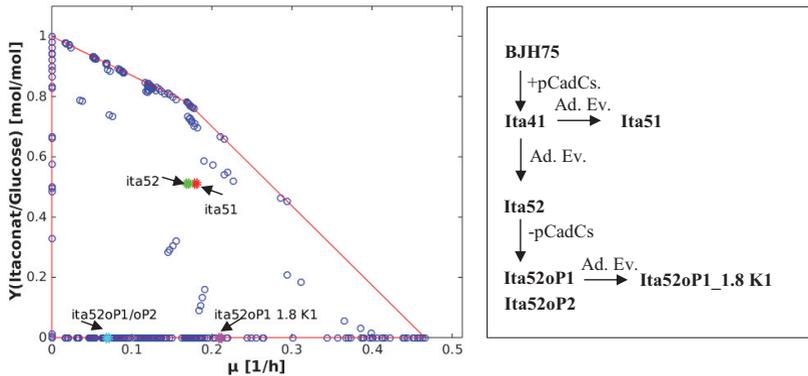


Abbildung 27: Aus dem Stoffwechselmodell abgeleitetes Trade-off-Diagramm für Itaconatausbeute versus Wachstumsrate für ita41. Die großen bunten Punkte markieren den Phänotyp der verschiedenen Stämme. Citrat und cis-Aconitat wurden als äquivalent zu Itaconat betrachtet (direkte Vorstufen von Itaconat), weshalb deren Ausbeute hier mit als Itaconatausbeute aufgetragen wurde. Die kleinen blauen offenen Punkte entsprechen den 668 elementaren Flussvektoren des Stoffwechselmodells. Durch Entfernung des Plasmids pCadCs aus ita52 wurden die Stämme ita52oP1/2 erstellt. Der Stamm ita52oP1_1.8 K1 wurde durch adaptive Evolution von ita52oP1 über 7 Verdünnungen erhalten. Die Stämme ita51 und ita52 sind bereits adaptierte Stämme (von ita41).

Durch Entfernung des Produktionsplasmides aus ita52 (ita52 oP1/2) reduzierten sich die Wachstumsrate und die Biomasseausbeute. Da die native Citratsynthase in ita52 deletiert ist, wurde kein Citrat mehr gebildet. Stattdessen war eine verstärkte Produktion von Pyruvat sowie die Produktion von Laktat zu beobachten (Tabelle 16). Für optimales Wachstum ist laut Modell unter Berücksichtigung der gemessenen Produktionsraten von Pyruvat, Laktat und Acetat ebenfalls ein hoher Fluss über den Pentosephosphatwege erforderlich ($r_{G6PD} \geq 80\% r_{GLC}$ (Tabelle A5)). Dies lässt sich mit dem eingeschränkten Fluss über die Glykolyse erklären. Ohne weitere Nebenprodukte kann nur 60 % der Glucose über die Glykolyse verstoffwechselt werden. Die Ergebnisse von ita52 und ita52oP1/P2 deuteten an, dass die Itaconatsynthese schwach gekoppelt sein könnte. Das bedeutet, dass bei maximalem Wachstum die Produktion von Itaconat essentiell ist. Um dies zu untermauern wurde der Stamm ita52oP1 über 36 Generationen (7 Verdünnungen) evolviert. Der evolvierte Stamm ita52oP1_1.8_K1 verdreifachte seine Wachstumsrate und erreichte eine etwas höhere Biomasseausbeute als ita52. Somit kann auch noch nicht von einer schwachen Kopplung gesprochen werden. Im Vergleich zum Ausgangsstamm ita52oP2 reduzierte sich die Anzahl der Nebenprodukte auf Pyruvat und Acetat. Zudem verringerte sich die Acetatausbeute. Laut Modell wäre somit auch eine maximale Wachstumsrate von $0,30 \text{ h}^{-1}$ möglich. Die reduzierte Wachstumsrate kann entweder durch eine sehr hohe zyklische Verwendung des Pentosephosphatweges ($G6PD = 199\% \text{ von GLC}$) oder durch noch unbekannte Nebenprodukte erklärt werden. Im Stamm ita52oP1_1.8 K1

fanden sich im Vergleich zu ita52 vier zusätzliche Mutationen. Eine Mutation in der Dihydropyridinase führt zu einem Austausch von Glutamat gegen Alanin an Position 205 des Proteins. Diese Aminosäure ist an der Bindung von NAD im Pyruvatdehydrogenasekomplex beteiligt (UniProt, 2017b). Um den Effekt dieser Veränderung auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase zu untersuchen müssten erst enzymatische Messungen durchgeführt werden. Eine weitere Mutation fand sich im Gen *ydbD* (Tabelle A4), welches für ein Methylglyoxalresistenzprotein codiert. Dies könnte auf einen aktiven Methylglyoxalweg hindeuten. Weiterhin fanden sich Deletionen in den Genen *glnB* und *nadR*. Ersteres codiert für einen Stickstoffregulator, welcher die Aktivität der Glutaminsynthase reguliert. Letzteres codiert für ein Protein, welches die Biosynthese von NAD reguliert und Reaktionen im NAD-Stoffwechsel katalysiert.

Tabelle 16: Adaption von ita41 und ita52. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Raten auf die exponentielle Phase. Die Stämme ita52oP1 und ita52oP2 produzierten auch Laktat mit einer Ausbeute von 0,39 mol/(mol Glucose). N.b: nicht bestimmt, da kein Wachstum.

Stamm	μ [h ⁻¹]	r _s [mmol/gBTM/h]	Y _(BTM/Glc) [g/mmol] Gesamt	Y _(Itaconat/Glc) [mol/mol] Gesamt	Y _(Citrat+cis-Aconitat/Glc) [mol/mol] Gesamt	Y _(Pyruvat/Glc) [mol/mol]	Y _(Acetat/Glc) [mol/mol]
ita41	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
ita51	0,17	3,6	0,047	0,19	0,32	0,16	0,25
ita52	0,18	4,1	0,044	0,21	0,30	0,11	0,28
ita52o P1	0,07	1,86	0,036	0	0	0,53	0,35
ita52o P2	0,07	1,94	0,034	0	0	0,55	0,30
ita52o P1_1.8 K1	0,21	4,22	0,05	0	0	0,56	0,16

4.5.3. Zusammenfassung

Die Adaptionen bestätigten die Modellvorhersage, dass ohne vollständige Implementierung eines Cut Sets noch keine obligatorische Kopplung von Biomasse- und Produktsynthese erzwungen wird. Zwar wurde mit allen Produktionsstämmen (mit pCadCs) auch nach der Adaption eine Mindestausbeute an Itaconat oder deren Vorstufen (Citrat, cis-Aconitat) von 0,5 mol/(mol Glucose) erzielt, jedoch wuchsen die Stämme ohne Plasmid etwas schneller und bildeten mehr Biomasse. Dass bereits Itaconat mit einer hohen Ausbeute produziert wird ist neben den bereits implementierten KOs vermutlich auch auf den deregulierten TCA-Zyklus (*gltA* aus *C. glutamicum*) zurückzuführen. Für die Fermentation ist das jedoch nicht von Bedeutung, da hier nur 4 Generationen erreicht werden. Ein Verlust des gewünschten Produktionsverhaltens während der Bioreaktorkultivierung ist somit unwahrscheinlich. Auch eine zusätzliche Iteration mit Inaktivierung der Malatdehydrogenase erzwang keine obligatorische Kopplung. Laut Cut Set würden somit noch zwei weitere

Deletionen benötigt. Als logisches nächstes Target erscheint der Pentosephosphatweg (PPW). Ohne Itaconatproduktion ist laut Modell der Fluss über die Glykolyse begrenzt. Somit ist für schnelles Wachstum ein hoher, teils sogar zyklischer Fluss über den PPW essentiell. Vermutlich führt die Anreicherung von glykolytischen Intermediaten zur Inhibierung der Glykolyse und somit zu einem hohen Fluss über den PPW. Der Versuch den oxidativen PPW durch Inaktivierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD, *zwf*) in BJH30 auszuschalten war nur bedingt erfolgreich. Zwar konnte per P1-Transduktion der *zwf*-KO von einer Einzelmutante auf BJH30 übertragen werden, jedoch wurde dabei wieder das benachbarte *pykA*-Gen ins Genom integriert. Die Verwendung der Wanner-Methode für den *zwf*-KO war hingegen nicht erfolgreich. Eine Alternative könnte hier die Inaktivierung der 6-Phosphogluconlactonase (PGL, *pgl*) darstellen. Diese befindet sich im Genom nicht in der Nähe bereits deletierter Gene. Die Inaktivierung der PGL in BJH75 (BJH30 Δ *mdh*) würde laut Modell zumindest schon eine schwache Kopplung erzwingen (Abbildung A10). Die verbleibenden Synthesewege ohne Itaconatproduktion würden dann geringeres Wachstum erzielen und die Produktion von Pyruvat über den Methylglyoxalweg voraussetzen.

4.6. Dynamische Regulierung der Itaconatproduktion

4.6.1. Theoretische Untersuchung des Einflusses der Prozessführung auf die volumetrische Produktivität

Im Kapitel 4.4 wurde gezeigt, dass ein genetisch optimierter *E. coli*-Stamm in der Lage ist Itaconat mit hoher Ausbeute zu produzieren. Durch die Umleitung zellulärer Ressourcen für die Produktbildung reduzierte sich jedoch die Wachstumsrate deutlich (auf $0,03-0,09 \text{ h}^{-1}$). Neben einer hohen Ausbeute wird jedoch für Bioprozesse auch eine hohe volumetrische Produktivität gefordert. Es ist somit nötig eine optimale Balance zwischen Wachstum und Produktbildung zu finden (Zhuang et al., 2013).

Um den Einfluss der Wachstumsrate und der Itaconatausbeute auf die Produktivität zu untersuchen, wurde für verschiedene Ausbeuten und zwei verschiedene Glucoseaufnahmeraten (r_{Glucose}) von 3 bzw. 5 mmol/g BTM/h und verschiedene Itaconatausbeuten die Wachstumsrate durch FBA optimiert (μ_{max}). Hierfür wurden die Modellannahmen aus Iteration 3 (Kapitel 4.4.3) übernommen, um den Stamm *ita23* abzubilden. Diese beinhalteten die Inaktivierung der Reaktionen SUCS, ICL, PYK, PTA, ETOH_Ex, Form_Ex, Lac_Ex und Succ_Ex sowie ein minimaler Energiebedarf für Maintenance Prozesse ($r_{\text{ATPmaint}} \geq 8,39 \text{ mmol/g BTM/h}$). Zusätzlich wurde die Isocitratehydrogenase inaktiviert. Die Biomasseendkonzentration (X_E) wurde durch Multiplikation der Biomasseausbeute ($Y_{X/S} = \mu_{\text{max}}/r_{\text{GLC}}$) mit der eingesetzten Glucose, und anschließender Addition der Startbiomasse ($X_0 = 0,2 \text{ g/l}$) bestimmt. Entsprechend konnte auch die Itaconatkonzentration über die Itaconatausbeute bestimmt werden ($C_{\text{Itaconat},E} = c_{\text{GLC},0} \cdot Y_{\text{Itaconat/Glc}}$). Die Kultivierungsdauer entspricht der Zeit, welche bei gegebenen exponentiellen Wachstum nötig ist, um die berechnete Biomasse zu generieren ($\Delta t =$

($\ln(X_E/X_0)/\mu_{\max}$). Die volumetrische Produktivität ergab sich dann durch Division der Itaconatkonzentration durch die Kultivierungsdauer ($q_{\text{Itaconat}} = c_{\text{Itaconat},E}/\Delta t$). In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Berechnungen graphisch dargestellt.

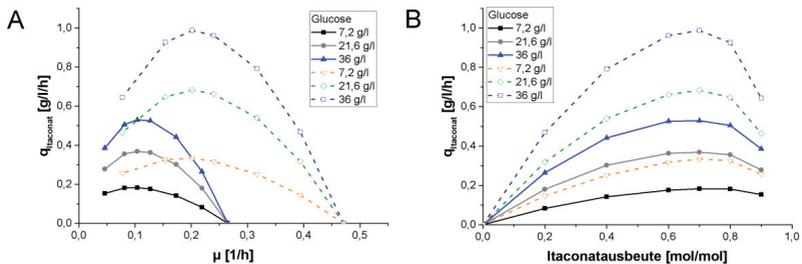


Abbildung 28: Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von A) der spezifischen Wachstumsrate μ und B) der Itaconatausbeute bei gekoppelter einstufiger Produktion von Biomasse und Itaconat. Die maximale spezifische Wachstumsrate wurde mit Hilfe des Modells für die verschiedenen Itaconatausbeuten über FBA bestimmt. Dazu wurde im Modell für ATPmaint eine minimale Rate von 8,39 mmol/gBTM/h gefordert und es wurden die Reaktionen SUCS, ICD, ICL, PYK, Succ_Ex, Eth_Ex, Form_Ex und Lac_Ex im Modell inaktiviert (entspricht ita23). Es wurden zwei verschiedene Glucoseaufnahmeraten (3 mmol/gBTM/h (geschlossene Linie) und 5 mmol/gBTM/h (gestrichelte Linie)) für verschiedene Glucosestartkonzentrationen (7,2-36 g/l) untersucht.

Die höchste Produktivität wird bei Itaconatausbeuten von 0,6-0,8 mol/(mol Glucose) erreicht. Bei höherer Ausbeute und hoher eingesetzter Substratmenge verringert sich hingegen die Produktivität. Einen großen Einfluss auf die Produktivität hat die Glucoseaufnahmerate, da durch sie das Wachstum wesentlich beeinflusst wird. Bei der höheren Aufnahmerate von 5 mmol/gBTM/h verdoppelt sich die Wachstumsrate im Bereich der optimalen Produktivität. Somit erhöht sich die volumetrische Produktivität deutlich um ca. 80 %. Für die wachstumsgekoppelte Produktion (einstufiger Prozess) mit hoher Produktivität sind daher eine relativ hohe Itaconatausbeute und eine hohe Glucoseaufnahmerate förderlich. Letztere kann, wie in Kapitel (4.4.1) gezeigt, durch adaptive Evolution verbessert werden.

Die Abbildung 28B verdeutlicht, dass es ein Optimum von Itaconatausbeute und Itaconatproduktivität gibt. Wird die Ausbeute weiter erhöht, so reduziert sich die Produktivität. Grund hierfür ist die deutliche Reduktion der Wachstumsrate (siehe Abbildung 28A). Eine Möglichkeit diesen Trade-off zwischen maximaler Produktivität und maximaler Ausbeute zu umgehen besteht in der Entkopplung von Produktbildung und Wachstum in einem zweistufigen Prozess (Burg et al., 2016). In der ersten Stufe eines zweistufigen Prozesses erfolgt zunächst die Bildung der Biomasse bei maximalem Wachstum. Die anschließende zweite Stufe dient der Produktbildung bei maximaler Ausbeute. Um den Effekt eines solchen Prozesses auf die Produktivität der Itaconatproduktion zu simulieren, wurden als Grundlage die vorigen Berechnungen mit einer r_{Glucose} von 3 mmol/gBTM/h genommen. Es sollten 36 g/l Glucose mit einer Ausbeute von 0,7 mol/(mol Glucose) in Itaconat umgesetzt werden. Die restliche Glucose sollte für die Biomasseproduktion verwendet werden. Beim einstufigen Prozess ist die

Produktion mit dem Wachstum ($\mu_{\max} = 0,104 \text{ h}^{-1}$, durch FBA berechnet) gekoppelt. Die erste Stufe des zweistufigen Prozesses kennzeichnet sich durch ein Wachstum mit einem μ_{\max} von $0,265 \text{ h}^{-1}$ ohne Bildung von Itaconat. Für die stationäre Phase (2. Stufe) wurde dann die Produktion von Itaconat mit maximaler Ausbeute ($1 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$) angenommen. Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Abbildung 29 dargestellt.

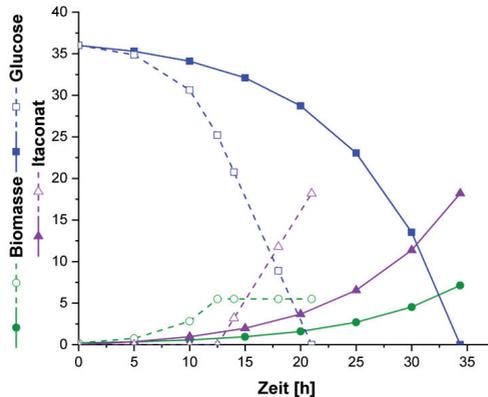


Abbildung 29: Vergleich eines hypothetischen einstufigen (geschlossene Symbole) mit einem zweistufigen (offene Symbole, gestrichelte Linie) Prozess. Es wird exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von $0,104 \text{ h}^{-1}$ (einstufig) und $0,265 \text{ h}^{-1}$ (zweistufig) angenommen. Für beide Prozesse wurde eine Gesamtausbeute von $0,7 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$ gefordert. Im zweistufigen Prozess erfolgt die Produktion in der stationären Phase mit einer Ausbeute von $1 \text{ mol}/(\text{mol Glucose})$. Die Glucose wird mit einer Rate von $3 \text{ mmol}/\text{gBTM}/\text{h}$ aufgenommen. Die Biomasseausbeuten betragen $0,0347$ (einstufig) und $0,0883$ (zweistufig). Die Startkonzentration der Biomasse beträgt $0,2 \text{ g/l}$.

Durch den zweistufigen Prozess verkürzt sich für das hypothetische Beispiel die Kultivierungsdauer von $34,4$ auf 21 h . Somit erhöht sich die volumetrische Produktivität um 64% auf $0,87 \text{ g/l/h}$. Die Biomasseausbeute hingegen ist im Vergleich zur wachstumsgekoppelten Produktion aufgrund der erhöhten CO_2 -Abgabe in der Wachstumsphase des zweistufigen Prozesses um 23% reduziert. Der gleiche Prozess, jedoch mit einer Aufnahme rate von $5 \text{ mmol}/\text{gBTM}/\text{h}$, ermöglicht die Itaconatproduktion mit einer Produktivität von $1,52 \text{ g/l/h}$ ($+54 \%$ im Vergleich zu 1-Phasenkultivierung) und einer Biomasseausbeute von $0,028 \text{ g/mmol}$ (-30%).

4.6.2. Implementierung eines molekularen Schalters zur temperaturabhängigen Kontrolle des Wachstums

Die theoretischen Betrachtungen hatten gezeigt, dass ein optimaler zweistufiger Prozess eine Erhöhung der volumetrischen Produktivität ermöglicht. Nun sollte *in vivo* untersucht werden, ob ein solcher Effekt auch durch eine reale Anwendung erzielt werden kann. Um die Produktion in *ita23* zu entkoppeln, musste mindestens einer der statischen KOs durch einen dynamischen Knockdown ersetzt werden. Als Ansatzpunkt für die Regulation wurde die Isocitratdehydrogenase (ICD) gewählt. Mit einer dynamische Regulierung der ICD ist auch der SUCS-KO im TCA-Zyklus nicht mehr erforderlich. Ist die Isocitratdehydrogenase aktiv, so kann außerdem sowohl Glutamat als auch ATP für das Wachstum bereitgestellt werden. Eine Inaktivierung hingegen blockiert den TCA-Zyklus und somit das Wachstum ohne Glutamatzugabe und begünstigt die Itaconatproduktion. Von den in Abschnitt 2.2.2 vorgestellten Methoden zur dynamischen Regulierung der Genexpression wurde der temperaturabhängige Promotor ausgewählt. Dieser ermöglicht die Expression von Genen bei 37 °C (Repressor CI857 inaktiv), der optimalen Wachstumstemperatur von *E. coli*, und inhibiert die Expression bei 30 °C (CI857 aktiv), der idealen Temperatur für die Itaconatproduktion (Abbildung 30).

Um zu zeigen, dass das Wachstum dynamisch über die temperaturabhängige Expression der ICD reguliert werden kann, wurden analog zu Zhou (Zhou et al., 2015) in MG1655 der Promotor und die nicht-translatierte Region des *icd*-Gens durch die Lambda Promotoren p_R und p_L sowie eine künstliche Ribosomenbindestelle ersetzt. Die autoregulierte Expression des Repressors CI857 erfolgte über den Promotor für Repressormaintenance (p_{RM}). Bindet der Repressor an die Operatorregion 2 (O_{R2}) von p_R , so wird die Expression aktiviert. Bei hohen Konzentrationen hingegen wird die Expression durch die Bindung des Repressors an die Operatorregion 3 (O_{R3}) inhibiert (Meyer et al., 1980). Der so konstruierte Stamm BJH48 (MG1655 $\Delta Picd_untranslReg::cam_CI857_p_R_p_L_synthRBS$) zeigte das gewünschte Wachstumsverhalten: Eine hohe Wachstumsrate von $0,43 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ bei 37 °C und langsames Wachstum mit einem μ von $0,05 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ bei 30 °C (Abbildung 31). Im Vergleich zur *icd*-Expression im Wildtyp bei 37 °C reduzierte sich die Expression in BJH48 bei 37 °C um das 5-fache und bei 30 °C um das 152-fache. Zudem zeigte BJH48 bei 30 °C mit 0,008 U/mg Protein nahezu keine ICD-Aktivität (Wildtyp: 1 U/mg Protein). Die relativ niedrige Enzymaktivität von 0,02 U/mg Protein bei 37 °C deutet daraufhin, dass bereits ein kleiner ICD-Fluss für ein schnelles Wachstum ausreichend ist.

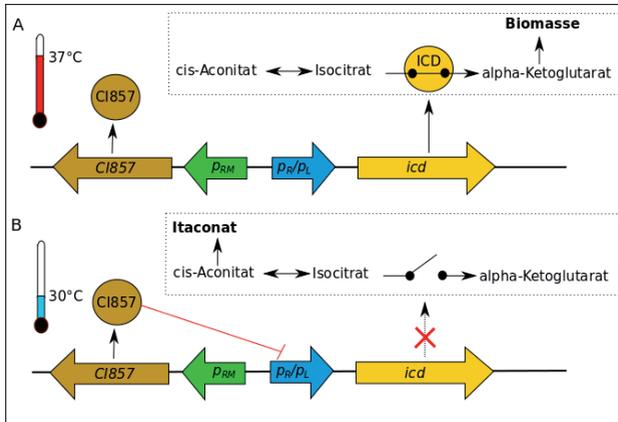


Abbildung 30: Dynamische Kontrolle der *icd*-Expression. A) Da der Repressor CI857 bei 37 °C inaktiv ist, wird das *icd*-Gen über die Promotoren p_R/p_L exprimiert. Der somit geschlossene TCA-Zyklus ermöglicht die Produktion von Biomasse. B) Bei 30 °C ist der Repressor aktiv und blockiert somit die *icd*-Expression und folglich den TCA-Zyklus. Der Fluss wird dadurch zur Itaconatproduktion umgeleitet. Der Repressor CI857 wird über den Promotor für Repressormaintenance p_{RM} exprimiert.

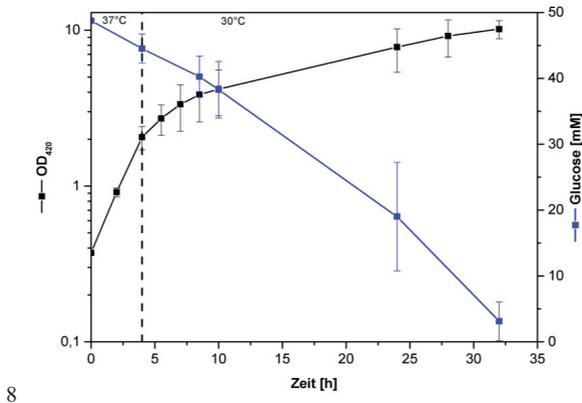


Abbildung 31: 2-Phasenkultivierung von BJH48 (MG1655 $\Delta Picd_untranslReg::cam_CI857_p_R_p_L_synthRBS$). Die erste Phase erfolgte bei 37 °C. Danach wurde die Kultur kurz in kaltem Wasserbad abgekühlt und anschließend bei 30 °C inkubiert.

4.6.3. Dynamische Regulation der Itaconatproduktion

Um die temperaturabhängige Kontrolle der ICD auf die Itaconatproduktion zu übertragen, musste zunächst ein reduzierter KO-Stamm konstruiert werden. Diesem Stamm (ita32) fehlen im Vergleich zu ita23 der *sucCD*-KO und der veränderte *icd*-Promotor (Abbildung 32). Ohne das Plasmid pCadCs (BJH38 = MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF$) zeigte der Stamm bis auf die reduzierte Acetatproduktion ein zum Wildtyp identisches Wachstumsverhalten (Tabelle 17). Beim Stamm mit Plasmid (ita32 = MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF$ /pCadCs) verschob sich der Phänotyp leicht in Richtung Glutamatproduktion. Grund hierfür ist vermutlich ein in Folge der Expression der feedbackresistenten Citratsynthase aus *C. glutamicum* unausgeglichener Fluss durch den TCA-Zyklus. Da das Glutamat auch in der zweiten Phase wieder aufgenommen werden kann und der Stamm bei 37 °C mit einer hohen Wachstumsrate von 0,52 h⁻¹ wuchs, eignet er sich gut als Ausgangsstamm für die dynamische Regulierung.

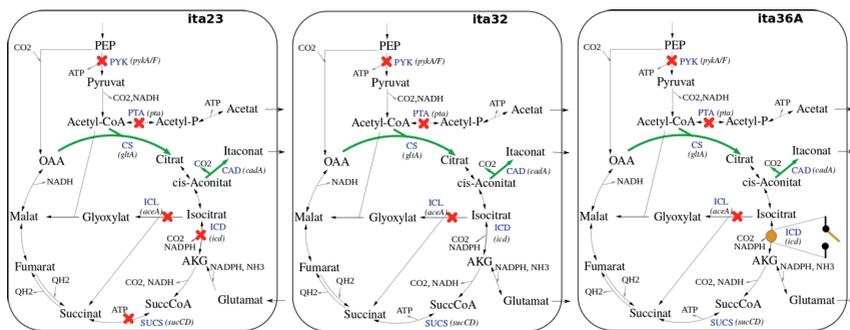


Abbildung 32: Schematische Darstellung der metabolischen Netzwerke von ita23 (blockierter TCA-Zyklus), ita32 (offener TCA-Zyklus) und ita36A (temperaturabhängiger Fluss durch den TCA-Zyklus). Die roten Kreuze stehen für eine Gendelektion, oder im Falle vom ICD in ita23 für eine starke Abschwächung der Expression. Die temperaturabhängige Regulation ist durch einen orangen Punkt angedeutet. Eine verstärkte Expression ist durch grüne Pfeile gekennzeichnet.

Wie schon in BJH48 wurden auch in BJH38 der Promotor und die 186 bp vor dem Gen inklusive der natürlichen Ribosomenbindestelle (RBS) gegen die Lambda Promotoren und eine künstliche RBS ausgetauscht. Der so konstruierte Stamm BJH58 (MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF \Delta Picd_untranslReg::cam_CI857_PR_PL_synthRBS$) zeigte jedoch überraschenderweise nur langsames Wachstum mit einem μ von 0,14 h⁻¹. Grund hierfür ist vermutlich die niedrige *icd*-Expression (16 mal niedriger als im Wildtyp) und die dadurch bedingte niedrige Aktivität der ICD (0,02 ± 0,01 U/mg Protein). Eine Verringerung der Expression und eine ebenso niedrige Enzymaktivität konnten aber bereits in BJH48 (MG1655 $\Delta Picd_untranslReg::cam_CI857_PR_PL_synthRBS$) beobachtet werden. Dennoch war dieser Stamm in der Lage relativ schnell zu wachsen. Offensichtlich ist mindestens eine der in BJH58 deletierten Reaktionen verantwortlich für das langsamere Wachstum im Vergleich zu BJH48. Um dies zu ergründen wurde der Stamm BJH48 in einer Schüttelkolbenkultivierung bei 37 °C genauer charakterisiert. Die Glucose wurde dabei nahezu vollständig in Biomasse umgesetzt

($0,094 \pm 0,01$ g BTM/mmol). Acetat, das Nebenprodukt vom Wildtyp bei 37 °C ($0,34$ mol/mol), wurde nur in sehr geringen Mengen ausgeschieden.

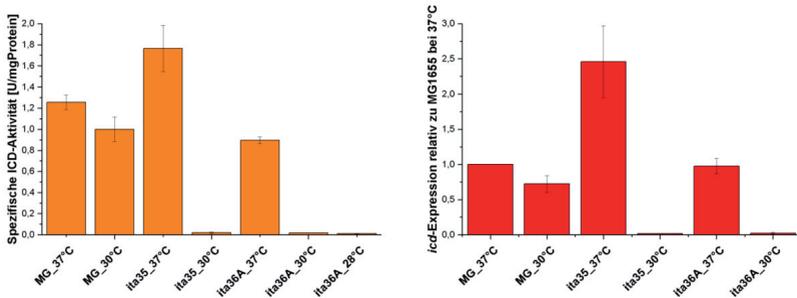


Abbildung 33: Expressionsstärke und Aktivität der Isocitratdehydrogenase im Wildtyp (MG1655) und den dynamisch regulierten Itaconatstämmen. Links: Spezifische Aktivität in Proteinextrakten der jeweiligen Stämme bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration. Rechts: Relative Expression des *icd*-Gens normiert auf die Expression im Wildtyp bei 37 °C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen zwischen zwei unabhängigen biologischen Replikaten (Enzymaktivität) und drei unabhängigen biologischen Replikaten (Expression). Die Expression von *ita36A* bei 28 °C wurde nicht bestimmt.

Dieses spricht für eine Aktivierung des Glyoxylatshunts. Diese Vermutung wird durch das Modell untermauert. Für die Modellierung wurden $r_{GLC} = 5$ mmol/g BTM/h, $r_{ATP_{\text{maint}}} \geq 3,15$ mmol/g BTM/h, $r_{G6PD} \leq 2,5$ mmol/g BTM/h (kein zyklischer PPP) und $\mu = 0,43$ h⁻¹ angenommen. Für den Wildtyp reicht unter diesen Bedingungen bereits ein minimaler ICD-Fluss von 0,5 mmol/g BTM/h bei gleichzeitig hohem Fluss durch den Glyoxylatweg (2,30 mmol/g BTM/h) für ein schnelles Wachstum aus. Für einen Stamm mit ICL-KO hingegen ist für die gleiche Wachstumsrate ein ICD-Fluss von 2,55 mmol/g BTM/h erforderlich.

Die Expression von Genen wird nicht nur durch den Promotor beeinflusst, sondern auch durch die Stabilität der mRNA oder die Translationseffizienz. So zeigte beispielsweise De Mey (De Mey et al., 2010), dass die Sequenz zwischen Transkriptions- und Translationsstart einen signifikanten Effekt auf die Expressionsstärke hat. Dieser Bereich wurde jedoch bei der Konstruktion von BJH58 entfernt. Daher war zu vermuten, dass durch Beibehalten dieses Sequenzabschnittes die Expression erhöht werden kann. Um dies zu testen, wurde nur der natürliche Promotor durch die Lambda Promotoren ersetzt. Die 115 bp vor dem *icd*-Gen, inklusive der natürlichen RBS blieben somit erhalten. Der so konstruierte Stamm (BJH68) wuchs mit der Wachstumsrate des Wildtyps. Mit dem Plasmid pCadCs (*ita35* = MG1655 *ΔaceA Δpta ΔpykA ΔpykF ΔPicd:: cam_CI857_pR_PL* /pCadCs) war die Wachstumsrate identisch mit der Rate des unregulierten Stammes *ita32* (Tabelle 17). Auch zeigte der Stamm *ita35* bei 30 °C das gewünschte Verhalten mit wachstumsgekoppelter Itaconatproduktion von 0,66 mol/(mol

Glucose) bei einer Wachstumsrate von $0,11 \text{ h}^{-1}$. Die Expression der ICD in ita35 bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ war im Vergleich zum Wildtyp (bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$) um das 57-fache reduziert (Abbildung 33). Bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ hingegen war sie im Vergleich zum Wildtyp mehr als verdoppelt. Daher wurde ein zweiter Stamm (ita36A) mit nur einem Lambda Promotor (p_R) konstruiert. Dieser zeigte eine reduzierte ICD-Aktivität (Abbildung 33) und ein leicht verringertes Wachstum bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, behielt aber bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ den Phänotyp von ita35. Als kritisch für die Kultivierung von ita36A erwies sich die Reproduzierbarkeit bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. So konnten bei schlechtem Wachstum in der zweiten Vorkultur (in MOPS-Medium) in der Hauptkultur ausgeprägte lag-Phasen oder gar geringes Wachstum ($\mu < 0,2 \text{ h}^{-1}$) beobachtet werden. Offensichtlich variiert die Zeit, die die Zellen benötigen, um den Stoffwechsel von Wachstum auf Komplexmedium auf Wachstum auf Minimalmedium anzupassen. In der ersten Vorkultur in LB-Medium bildeten sich zudem ungewöhnlich lange Zellen, was auf einen Zellteilungsdefekt hindeuten könnte. Diese langen Zellen waren auch in den langsam wachsenden Kulturen in Minimalmedium zu beobachten. Für eine bessere Reproduzierbarkeit wurde daher im Folgenden beim Stamm ita36A auf Komplexmedium verzichtet. Der Stamm wurde auf Minimalplatten (TN-Platten) angezogen und davon direkt in eine Vorkultur mit MOPS-Medium (Vk^{MM}) überführt. Ein so kultivierter Stamm zeigte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Vergleich zu den Kultivierungen mit zwei Vorkulturen ($Pk^{L,MM}$) eine höhere Wachstumsrate und eine weiter reduzierte Glutamatproduktion (Tabelle 17). Die Produktion bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ verringerte sich geringfügig, konnte aber durch Absenken der Temperatur auf $28 \text{ }^\circ\text{C}$ wieder erhöht werden. In Extrakten von ita36A bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $30 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde eine ähnlich niedrige ICD-Aktivität bestimmt ($0,01$ bzw. $0,02 \text{ U/mg Protein}$) wie bei ita23. Der Unterschied zwischen den Stämmen bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ist somit nur der *sucCD*-KO in ita23. Anders als ita23 wuchs ita36A auch ohne Glutamat bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einem μ von $0,14 \text{ h}^{-1}$. In ita36A kann aufgrund der aktiven Succinyl-CoA-Ligase (SUCS) noch Succinyl-CoA aus Succinat regeneriert werden, weshalb anscheinend ein geringer ICD-Fluss für das Wachstum des Stammes ausreicht.

Tabelle 17: Schüttelkolbenkultivierung der verschiedenen Stämme bei 28, 30 oder 37°C. $V_k^{L,MM}$: eine Vorkultur in LB₀ gefolgt von einer in MOPS-Medium. V_k^{MM} : nur eine Vorkultur in MOPS-Medium. n.g. = nicht gemessen. BJH38 (MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF$), ita32 (BJH38 pCadCs), BJH58 (MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF \Delta Ptdc_{untransl}Reg::cam_{CI857_pr_pl_synthRRS}$), ita35 (MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF \Delta Ptdc::cam_{CI857_pr_pCadCs}$), ita36A (MG1655 $\Delta aceA \Delta pta \Delta pykA \Delta pykF \Delta Ptdc::cam_{CI857_pr_pCadCs}$).

Stamm	Temperatur/ Vorkultur	μ [hr ⁻¹]	$r_{Glucose}$ [mmol/gDW/h]	$Y_{ETM/Glucose}$ [g/gmmol]	Ausbeute [mol/mol(Glucose)]				
					Itraconat	Glutamat	Acetat	Pyruvat	
MG1655	30°C $V_k^{L,MM}$	0.36 ± 0.01	4.36 ± 0.27	0.082 ± 0.003	0	0.00 ± 0.00	0.34 ± 0.00	0 ± 0	
	37°C $V_k^{L,MM}$	0.71 ± 0.01	7.62 ± 0.08	0.095 ± 0.004	0	0.01 ± 0.02	0.34 ± 0.04	n.g.	
BJH38	37°C $V_k^{L,MM}$	0.69 ± 0.01	7.64 ± 0.71	0.093 ± 0.006	0	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.01	n.g.	
ita32	30°C $V_k^{L,MM}$	0.34 ± 0.03	4.74 ± 0.38	0.074 ± 0.010	0.01 ± 0.01	0.17 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0 ± 0	
	37°C $V_k^{L,MM}$	0.52 ± 0.05	8.53 ± 0.43	0.062 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0 ± 0	
BJH58	37°C $V_k^{L,MM}$	0.14 ± 0.02	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	
ita35	30°C $V_k^{L,MM}$	0.11 ± 0.01	3.26 ± 0.80	0.034 ± 0.001	0.66 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.07	
	37°C $V_k^{L,MM}$	0.50 ± 0.03	8.98 ± 0.62	0.060 ± 0.005	0	0.37 ± 0.13	0.01 ± 0.01	0	
ita36A	30°C $V_k^{L,MM}$	0.12 ± 0.02	3.25 ± 0.70	0.034 ± 0.000	0.66 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.04	
	37°C $V_k^{L,MM}$	0.46 ± 0.12	7.05 ± 0.31	0.067 ± 0.031	0 ± 0	0.21 ± 0.16	0.01 ± 0.01	0 ± 0	
	37°C V_k^{MM}	0.53 ± 0.07	6.86 ± 0.06	0.078 ± 0.011	n.g.	0.11 ± 0.12	0.08 ± 0.01	n.g.	
	30°C V_k^{MM}	0.14 ± 0.01	3.82 ± 0.12	0.034 ± 0.000	0.62 ± 0.03	0 ± 0	0.10 ± 0.03	0.2 ± 0.03	
	28°C V_k^{MM}	0.12 ± 0.00	3.73 ± 0.03	0.031 ± 0.000	0.69 ± 0.01	n.g.	0.10 ± 0.01	0.17 ± 0.01	

4.6.4. Zweistufige Bioreaktorkultivierung

Im finalen Schritt sollte ein zweistufiger Bioreaktorprozess mit ita36A entworfen werden. Erste Versuche im Schüttelkolben bei 28 °C, ausgehend von einer Vorkultur bei 37 °C, zeigten ein verzögertes Umschaltverhalten. Die Produktion von Itaconat startete erst nach ca. 12 h. Grund hierfür ist die lange Halbwertszeit der Proteine, welche im Bereich von Stunden liegt (Venayak et al., 2015). Für den zweistufigen Prozess sollte nun diese Zeitverzögerung als Wachstumsphase dienen. Die Temperatur im Bioreaktor wurde daher schon zu Beginn auf 28 °C geregelt. Die einstufige und zweistufige Prozessführung unterschied sich somit nur in der Vorbereitung des Inoculums. Für den einstufigen Prozess wurde die Vorkultur für 8 h bei 37 °C und anschließend für 16 h bei 28 °C inkubiert. Für den zweistufigen Prozess hingegen erfolgte die Kultivierung der Vorkultur über die gesamte Kultivierungszeit (24 h) bei 37 °C.

Die unterschiedliche Vorbereitung der Vorkulturen ermöglichte es ita36A im zweistufigen Prozess zunächst 12 h mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ zu wachsen (Abbildung 34, Tabelle 18). Anschließend startete der Stamm bei einer reduzierten Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ mit der Itaconatproduktion (rote gestrichelte Linie, Abbildung 34). Innerhalb von 30 Stunden wurden somit 8 g/l Biomasse produziert, wohingegen die Zelldichte im einstufigen Prozess zu diesem Zeitpunkt nur 1,5 g/l betrug. Die hohe Biomasse im zweistufigen Prozess erlaubte innerhalb der ersten 60 h eine schnelle Umsetzung der Glucose in 32 g/l Itaconat (Abbildung 34) mit einer maximalen Produktivität von $0,86 \text{ g/l/h}$ (Abbildung 35). Beim einstufigen Prozess wurde diese Konzentration erst nach 95 h erreicht und bei ita23 erst nach 120 h (Abbildung 23). Die Itaconatausbeute in der Feeding-Phase des zweistufigen Prozesses war dabei identisch mit der Ausbeute von ita23 (Tabelle 17). In den verbliebenden 60 h des zweistufigen Prozesses stagnierte das Wachstum. Womöglich wurde das Wachstum durch die hohe Itaconatkonzentration ($> 25 \text{ g/l}$) inhibiert, oder ein Nährstoff lag in unzureichender Konzentration vor. In dieser Phase reduzierte sich die Glucoseaufnahme deutlich und somit auch die volumetrische Produktivität (Abbildung 35). Anscheinend wird die Aufnahmerate auf das Minimum reduziert, welches für die Produktion von Erhaltungsenergie (in Form von ATP) benötigt wird. Unter Verwendung der gemessenen Aufnahme- und Produktionsraten (Tabelle A6) nach der letzten Zufütterung ergeben sich für die stationäre Phase des einstufigen bzw. zweistufigen Prozesses maximale ATP-Produktionsraten von $3,95 \text{ mmol/g BTM/h}$ bzw. $2,71 \text{ mmol/g BTM/h}$. Der Maintenance-Bedarf für das aktuellste genomskalige Netzwerkmodell von *E. coli* wurde mit $3,15 \text{ mmol/g BTM/h}$ angegeben (Orth et al., 2011). Dieser Wert liegt nah an den für die stationäre Phase berechneten Werten. Dieses legt die Schlussfolgerung nahe, dass der ATP-Bedarf die treibende Kraft für die Itaconatsynthese in der stationären Phase ist.

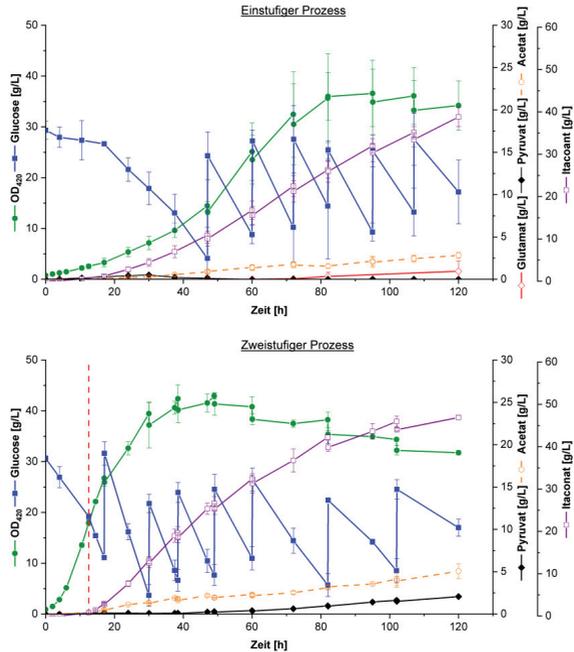


Abbildung 34: Einstufige und zweistufige Kultivierung von ita36A im Bioreaktor bei 28 °C. Die Prozesse unterschieden sich in den Vorkulturbedingungen. Die Vorkultur für den einstufigen Prozess wurde bei 28 °C (optimal für Produktion), die Vorkultur für den zweistufigen Prozess bei 37 °C (optimal für das Wachstum) inkubiert. Somit war in den ersten 12 Stunden des zweistufigen Prozesses schnelles Wachstum möglich. Anschließend erfolgt das Umschalten von Wachstum auf Produktion, was im unteren Graph durch die rote gestrichelte Linie angedeutet ist. Die Zugabe von Feedlösung äußert sich in dem sprunghaften Anstieg der Glucosekonzentration. Der einstufige Prozess wurde als Triplikate, der zweistufige Prozess als Duplikate durchgeführt. Die Standardabweichungen der unabhängigen Bioreaktorkultivierungen werden durch die Fehlerbalken dargestellt. Glutamat wurde in der zweistufigen Kultivierung nicht produziert.

Über die gesamte Kultivierungsdauer von 120 h betrachtet wurde durch den zweistufigen Prozess im Vergleich zum einstufigen Prozess eine um 22 % erhöhte Gesamtproduktivität und eine um 48 % erhöhte maximale Produktivität bei identischer Gesamtausbeute erzielt. Im Vergleich zu ita23 reduzierte sich zwar die Ausbeute um 9 % jedoch konnte dafür der Titer um 46 % auf 46,9 g/l und die maximale Produktivität um 91 % erhöht werden (Tabelle 18). Da sich die Glucoseaufnahme insbesondere zu Ende der Kultivierung stark verringerte, ist der Effekt der Prozessführung zu früheren Zeitpunkten noch stärker ausgeprägt. So kann nach 82 h sogar eine Produktivitätserhöhung um 62 % (im vgl. zum einstufigen Prozess) bestimmt werden.

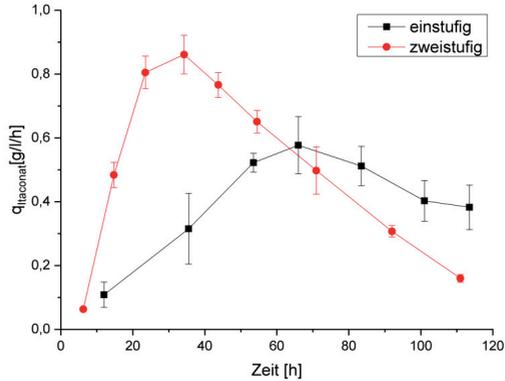


Abbildung 35: Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von ita36A von der Prozessführung und der Prozessdauer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der unabhängigen biologischen Proben.

Tabelle 18: Vergleich der Bioreaktorkultivierungen von ita36A bei 28 °C. 1-S = einstufige Kultivierung, Vorkultur bei 28 °C. 2-S = zweistufige Kultivierung, Vorkultur bei 37 °C. Ita23 wurde bei 30 °C kultiviert (4.3.4).

	Batch			Feed			Gesamt (0-120 h)		
	ita23 (1-S)	ita36A (1-S)	ita36A (2-S)	ita23 (1-S)	ita36A (1-S)	ita36A (2-S)	ita23 (1-S)	ita36A (1-S)	ita36A (2-S)
μ_{max} [h ⁻¹]	0,07 ± 0,00*	0,08 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,02 ± 0,00*	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,00			
Y _{Itaconat} [mol/mol]	0,54 ± 0,00*	0,58 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,71 ± 0,07*	0,60 ± 0,12	0,71 ± 0,02	0,68 ± 0,04*	0,62 ± 0,11	0,62 ± 0,00
Y _{Acetat} [mol/mol]	0,02 ± 0,01*	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,00*	0,09 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,04 ± 0,00*	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,03
Y _{Glutamat} [mol/mol]	-0,10 ± 0,01*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-0,08 ± 0,01*	0,03 ± 0,04	0,00 ± 0,00	-0,08 ± 0,01*	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
T _{Glucose} [mmol/gCDW/h]	3,13 ± 0,42*	2,94 ± 1,10	3,48 ± 1,42	1,39 ± 0,34*	0,99 ± 0,45	0,85 ± 0,39			
Itaconattiter [g/L]	9,2 ± 1,0*	10,9 ± 1,9	2,96 ± 0,20				32 ± 1*	38,8 ± 2,20	46,9 ± 0,5
Q _{Itaconat} [g/L/h]	0,22 ± 0,02*	0,24 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,38 ± 0,08*	0,38 ± 0,03	0,43 ± 0,00	0,27 ± 0,01*	0,32 ± 0,02	0,39 ± 0,00
Q _{Itaconat,max} [g/L/h]							0,45 ± 0,11 (58-79 h)	0,58 ± 0,09 (60-72 h)	0,86 ± 0,06 (30-38,5 h)
Biomasse [g/l]	2,0 ± 0,2*	3,0 ± 0,2	5,6 ± 0,1				3,4 ± 0,0*	7,2 ± 1,0	6,7 ± 0,1

4.6.5. Zusammenfassung

Die mikrobielle Zelle (hier *E. coli*) ist der Katalysator, welcher über eine Reihe von biochemischen Reaktionen das Substrat in das gewünschte Produkt umwandelt. Für eine schnelle Umsetzung und somit eine hohe volumetrische Produktivität ist eine hohe Konzentration des Katalysators (Biomasse) erforderlich. Anders als beim einstufigen Prozess, welcher gleichzeitig die Produktion der Biomasse und des Produktes ermöglicht, wird beim zweistufigen Prozess zunächst in der ersten Stufe die Biomasse gebildet, welche in der zweiten Stufe das Substrat in das Produkt umwandelt. Unter der Annahme identischer maximaler Substrataufnahmeraten in beiden Stufen, ermöglicht ein idealer zweistufiger Prozess für die Itaconatproduktion somit theoretisch eine Steigerung der Produktivität um ca. 60 % im Vergleich zum einstufigen Prozess.

Um den realen Effekt der Prozessführung auf die Itaconatproduktion zu untersuchen, wurde ein zweistufiger Prozess entworfen, welcher auf der temperaturabhängigen Kontrolle der *icd*-Expression beruht. Über diese kann der Fluss durch den TCA-Zyklus und somit das Wachstum reguliert werden. Es stellte sich heraus, dass die für ein schnelles Wachstum bei 37 °C in der ersten Stufe benötigte Aktivität der Isocitratdehydrogenase stammspezifisch ist. So war beim Wildtyp bereits eine niedrige Expression für ein schnelles Wachstum mit einem μ von 0,43 h⁻¹ ausreichend. Der dynamische Stamm für die Itaconatproduktion benötigte hingegen eine dem Wildtyp entsprechende Aktivität der ICD um schnell wachsen zu können. Bei niedriger Temperatur (28 °C) zeigte der dynamisch regulierte Itaconatstamm ita36A eine wachstumsgekoppelte Produktion von Itaconat mit einer Wachstumsrate von 0,12 h⁻¹ und einer Itaconatausbeute von 0,69 mol/mol. Für den Entwurf eines zweistufigen Prozesses musste nun noch die Umschaltzeit berücksichtigt werden, welche bei ita36A 12 Stunden betrug. Grund für diese lange Umschaltzeit ist vermutlich ein (zu) langsamer Abbau der in der Zelle vorhandenen ICD-Proteine. Dieses verzögerte Umschaltverhalten wurde dadurch berücksichtigt, dass die Kultivierungstemperatur im Bioreaktor direkt auf 28 °C eingestellt wurde. Da das Inoculum zuvor bei 37 °C inkubiert wurde, konnte ita36A dann in den ersten 12 Stunden mit einer Wachstumsrate von 0,25 h⁻¹ wachsen. Eine ähnliche Wachstumsrate wurde auch für das theoretische Beispiel angenommen. Anders als beim theoretischen Beispiel wuchs der Stamm aber anschließend noch mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,1 h⁻¹, welche sich im weiteren Kultivierungsverlauf zunehmend reduzierte. Ebenfalls ging mit der reduzierten Wachstumsrate eine reduzierte Glucoseaufnahmerate einher. Würde für das theoretische Beispiel aus Abbildung 29 für die zweite Stufe eine reduzierte Aufnahmerate von 1 statt 3 mmol/g BTM/h angenommen, so würde sich die Produktivität im Vergleich zum einstufigen Prozess sogar um 10 % reduzieren. Da sich in der Realität aber auch der einstufige Prozess nicht optimal verhielt, konnte durch den zweistufigen Prozess die Produktivität nach 120 h um 22 % erhöht werden. Der dynamisch regulierte Stamm war zudem in der Lage ohne Glutamat zu wachsen und der Titer der zweistufigen Kultivierung wurde im Vergleich zu ita23 um 46 % gesteigert.

Zum Ende der zweistufigen Kultivierung konnte eine deutliche Abnahme der Produktivität beobachtet werden. In dieser stationären Phase (60-120 h) stagnierte das Wachstum und die Glucoseaufnahmerate nahm stetig ab. Zudem wurde die Biomasse durch die Zugabe von Feedlösung und Lauge weiter verdünnt. Die Zellen nahmen in dieser Phase vermutlich nur soviel Glucose auf, wie sie für die Produktion von Erhaltungsenergie in Form von ATP benötigten. Dies resultierte dann in niedrigen Glucoseaufnahmeraten und somit in einer reduzierten volumetrischen Produktivität, die dann sogar unter der der einstufigen Strategie liegt (Abbildung 35).

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die Verwendung von bio-basierten Prozessen für die Produktion von Grundchemikalien reduziert die Abhängigkeit von fossilen (endlichen) Ressourcen und erhöht die Umweltverträglichkeit. So wird durch die mikrobielle Produktion von 1,3-Propandiol im Vergleich zur erdölbasierten Produktion 56 % weniger CO₂ produziert, und 42 % weniger Energie verbraucht (DuPont Tate Lyle Bio Products Company, 2016). Bis zur Kommerzialisierung eines Bioprozesses müssen jedoch hohe Hürden überwunden werden. Aufgrund des niedrigen Marktpreises sind hohe Ausbeuten (g/g), Titer (g/l) und volumetrische Produktivitäten (g/l/h) erforderlich. Als Paradebeispiel für die Entwicklung eines Bioprozesses vom Labor bis zum Industriemaßstab kann die Produktion von 1,4-Butandiol mit *E. coli* durch die Firma Genomatica angesehen werden (Burgard et al., 2016). Bis zum finalen Produktionsstamm waren 50 genetische Veränderungen inklusive der Integration eines synthetischen Produktionsweges notwendig (Barton et al., 2015).

Die ersten Schritte zu einem kommerziellen 1,4-Butandiol-Stamm umfassten die Implementierung und Optimierung des Biosyntheseweges sowie die modellbasierte Umleitung der Flüsse zum Produktionsweg (Yim et al., 2011). Ein vergleichbares Vorgehen wurde hier für die Produktion von Itaconat mit *E. coli* verfolgt. Der Biosyntheseweg von Itaconat besteht aus einem nicht-nativen Enzym, der cis-Aconitat-Decarboxylase (*cadA*). Um die Verwendung von teuren Induktoren zu vermeiden, erfolgte die Expression des codonoptimierten Gens über einen konstitutiven Promotor. Über das Produktionsplasmid pCadCs wurde zusätzlich die codonoptimierte Citratsynthase aus *C. glutamicum* exprimiert. Anders als das entsprechende Enzym aus *E. coli* wird dieses nicht durch hohe NADH-Konzentrationen inhibiert (Eikmanns, 1994). Die dadurch verursachte Deregulation des TCA-Zyklus hatte neben der Itaconatproduktion auch die Sekretion von Glutamat zur Folge. Itaconat wurde im ersten Produktionsstamm *ita1* jedoch nur mit geringer Ausbeute (0,04 mol/mol) produziert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde anschließend ein modellbasierter iterativer Ansatz verfolgt. Ziel war es die Produktion von Itaconat mit einer Mindestausbeute von 0,7 mol/mol an das Wachstum ($\mu > 0,01 \text{ h}^{-1}$) von *E. coli* zu koppeln. Die bis dahin mit *E. coli* erreichten Itaconatausbeuten betragen 0,09 mol/mol in Minimalmedium (Vuoristo et al., 2015a) und 0,2 mol/mol in Komplexmedium (Okamoto et al., 2014).

Für die Identifizierung geeigneter Interventionsstrategien wurde das Konzept der constrained Minimal Cut Sets (Hädicke and Klamt, 2011) gewählt. Dieses ermöglicht die Bestimmung aller möglichen Interventionsstrategien (Sets von Knockouts), die den Lösungsraum derart reduzieren, dass nur noch ein gewünschtes Verhalten (z.B. hohe Mindestausbeute und Mindestwachstumsrate) möglich ist. Für die Berechnung der Interventionsstrategien wurde ein kleines Zentralstoffwechselmodell von *E. coli* mit 112 Reaktionen verwendet. Ein komplexeres, genomskaliges Netzwerk war nicht nötig, da das Wachstums- und Produktionsverhalten des *ita1*-Stammes gut durch das kleinere Modell des Zentralstoffwechsels abgebildet wurde. Steht ein solches Modell nicht zur Verfügung, so kann auch ausgehend von

einem genomskaligen Modell ein reduziertes Modell mit den gewünschten Eigenschaften generiert werden (Erdrich et al., 2015). Die Verwendung eines komprimierten Modells bringt mehrere Vorteile mit sich. So ist es möglich alle Elementarmoden und somit alle möglichen Cut Sets zu berechnen. Aufgrund der geringeren Komplexität ist es auch einfacher grundlegende Prinzipien beispielsweise hinsichtlich der Kopplung von Produkt- und Biomassesynthese zu identifizieren. Zudem besteht das Zentralstoffwechselmodell aus gut charakterisierten Reaktionen, die nachweislich größere Flüsse transportieren. Bei genomskaligen Netzen können hingegen auch Stoffwechselwege favorisiert werden, über deren Regulation nur wenig bekannt ist und die vermutlich ohne Optimierung nur geringe Flusskapazitäten besitzen. Durch den verfolgten neuen adaptiven Ansatz war es zudem möglich, während der Stammkonstruktion das Modell und somit auch die Interventionsstrategie an einen veränderten Metabolismus anzupassen (Abbildung 36). Während der Konstruktion von ita23 wurden erst nach der ersten bzw. zweiten Iteration der Export von Pyruvat und die Aufnahme und Abgabe von Glutamat ins Modell integriert. Für die Modellierung wurden somit immer nur die Ausscheidereaktionen berücksichtigt, welche für den beobachteten Phänotyp relevant waren. Auch wenn *E. coli* bekanntermaßen Laktat produzieren kann, war beispielsweise eine Unterbrechung der Laktatdehydrogenase, wie es in der Studie von Vuoristo (Vuoristo et al., 2015a) verfolgt wurde, für die Konstruktion eines Itaconatüberproduzenten nicht notwendig.

Nach Berechnung der Cut Sets muss eine geeignete Interventionsstrategie ausgewählt werden. Für die Iteration 1 ausgehend von ita1 ergaben sich 945 Cut Sets. Da beim iterativen Vorgehen die KOs nacheinander in den Stamm eingebracht werden, ist eine Festlegung auf ein bestimmtes Cut Set zu Beginn nicht zwangsläufig notwendig. Es ist sinnvoll, die ersten KOs so zu wählen, dass eine möglichst große Flexibilität hinsichtlich der folgenden KOs verbleibt. So beinhalteten nahezu alle Cut Sets aus Iteration 1 Knockouts zur Unterbrechung des oxidativen TCA-Zyklus und des Glyoxylatweges. Die Unterbrechung konnte durch die Deletion verschiedener Reaktionen (ICL, MALS, AKGDH, SUCS, SUCDH) erfolgen. Für die Auswahl der geeigneten Targets bietet sich eine Literaturrecherche an. Im hier genannten Beispiel wurden die AKGDH und die SUCDH als Targets verworfen, da die Deletion dieser Reaktionen entweder zur Abhängigkeit von externem Succinat oder zur Produktion dieses Metaboliten führen (Causey et al., 2003; Lin et al., 2005). Somit verblieb SUCS als Target für die Unterbrechung des TCA-Zyklus. Im weiteren Verlauf der Stammkonstruktion wurden dann die Interventionsstrategien unter Berücksichtigung bereits erfolgter KOs und evtl. neuer aktiver Ausscheidereaktionen angepasst. Im Idealfall kann es vorkommen, dass bestimmte Reaktionsdeletionen für die Kopplung essentiell werden. So konnte die Pyruvatausscheidung nur durch Unterbrechung der Pyruvatkinase eingeschränkt werden. Wie in allen Metabolic Engineering Ansätzen sind Reaktionen zu Nebenprodukten geeignete Targets für die Optimierung der Produktion. Zur Selektion könnte weiterhin auch das resultierende Ausbeutediagramm herangezogen werden. Zu bevorzugen sind zunächst verbleibende Lösungsräume mit den höchsten Wachstumsraten, auch wenn bei diesen niedrigere gekoppelte Produktausbeuten erreicht werden als bei Cut Set

Strategien mit niedrigeren Wachstumsraten. Auch sollten solche Strategien bevorzugt werden, die maximale Produktausbeuten zumindest erlauben. Ideal ist eine resultierende Ausbeutefläche, wie sie für das Netzwerkbeispiel in (2.3.2) durch die cMCSs 2 und 3 entsteht (Abbildung 9, linearer Zusammenhang zwischen Biomasseausbeute und Produktausbeute). Mit sinkender Biomasseausbeute, welche üblicherweise während einer Bioreaktorkultivierung abnimmt, würde dann die Produktausbeute ansteigen.

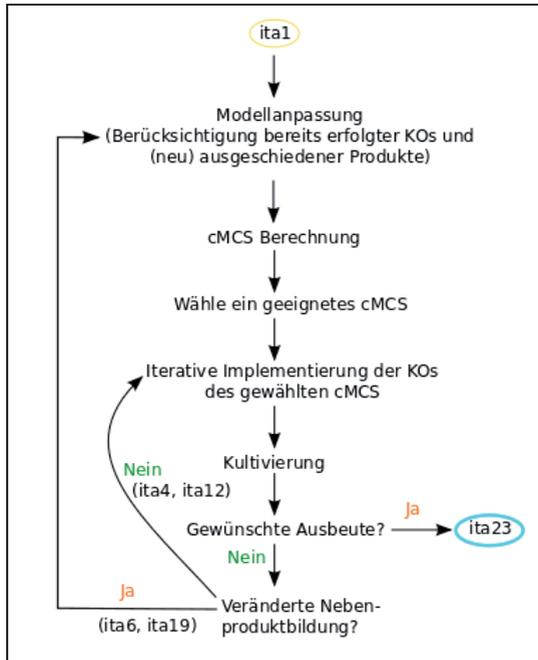


Abbildung 36: Iterativer modellbasierter Ansatz zur Konstruktion eines Produktionsstammes mit gewünschter Ausbeute. Der gewählte Ansatz beruht auf den constrained Minimal Cut Sets (cMCSs), welche die Produktion des Metaboliten mit einer gewünschten Mindestausbeute erzwingen. Die KOs des gewählten Cut Sets wurden iterativ implementiert und die erhaltenen Stämme in Schüttelkolbenkultivierungen charakterisiert. Traten signifikante Änderungen der Nebenproduktbildung auf, so wurde das Modell angepasst und ebenso die Interventionsstrategien durch Neuberechnung der Cut Sets. Die Raten bereits deletierter Reaktionen wurden dabei auf 0 gesetzt.

Durch drei iterative Zyklen aus Modellierung, Stammkonstruktion und Stammcharakterisierung wurde ein *E. coli*-Stamm (ita23 = MG1655 $\Delta aceA$ $\Delta sucCD$ $\Delta pykA$ $\Delta pykF$ Δpta $\Delta Picd::cam_P2$ /pCadCs) mit den gewünschten Eigenschaften konstruiert. In Schüttelkolbenkultivierungen konnte mit diesem Stamm eine hohe Ausbeute von 0,77 mol/(mol Glucose) erzielt werden. Diese ist vergleichbar mit den Ausbeuten von *A. terreus* (0,54-0,86 mol/mol (Kuenz et al., 2012)). Sowohl die Ausbeute, als auch der im Fed-batch-

Prozess erzielte Titer von 32 g/l waren die höchsten Werte, welche jemals für die heterologe Itaconatproduktion aus Glucose publiziert wurden. Der höchste Titer der in einer anderen Studie mit *E. coli* erzielt wurde betrug 18 g/l in Komplexmedium (Chang et al., 2017). Auch die Peak-Produktivität von 0,45 g/l/h stellte eine signifikante Verbesserung zu anderen heterologen Produktionsprozessen (mit Minimalmedium) dar. Für industrielle Produktionsprozesse muss jedoch eine Produktivität von > 2 g/l/h angestrebt werden. Mit der spezifischen Produktivität von 1,05 mmol Itaconat/g BTM/h aus der Feeding-Phase der Bioreaktorkultivierung, wäre (ohne Betrachtung der batch-Phase) eine Biomassekonzentration von 14 g/l erforderlich, um die geforderte Produktivität zu ermöglichen. In der Bioreaktorkultivierung wurde jedoch nur 3,5 g/l Biomasse gebildet. Grund hierfür ist die geringe Wachstumsrate von 0,07 h⁻¹, welche während der Kultivierung stetig abnahm. Für den Fall einer starken Kopplung von Produkt- und Biomassebildung kann diese jedoch durch adaptive Evolution ohne Verlust der hohen Produktausbeute optimiert werden.

Die adaptive Evolution von *ita23* erfolgte durch serielle Verdünnung des Itaconatstammes in Minimalmedium. Dabei konnte die Wachstumsrate deutlich auf 0,22 h⁻¹ verdoppelt werden. Da der Stamm jedoch in der Lage war auch ohne Plasmid, also ohne Itaconatbiosynthese, mit einer vergleichbaren Wachstumsrate zu wachsen, war (wie auch durch das Modell vorhergesagt) eine starke Wachstumskopplung noch nicht gegeben. Zudem reduzierte sich die Itaconatausbeute auf 0,61 mol/(mol Glucose). Daher wurde eine erneute Iteration ausgehend von *ita23* durchgeführt. Da die Glucoseaufnahmerate bei 30 °C vermindert ist, erfolgten die Berechnungen mit einer maximalen Aufnahmerate von 5 mmol/g BTM/h. Für eine starke Kopplung sind dann laut Modell drei weitere Knockouts zu implementieren. Als essentielles Target erwies sich die Unterbrechung der anaplerotischen Pyruvatproduktion durch Deletion der Malatdehydrogenase (MDH) oder dem Malatenzym (MALE). Dieser Weg ist vermutlich für die Pyruvatproduktion in den adaptierten Stämmen von BJH30 (*ita23* ohne Plasmid) verantwortlich. Die Deletion der MDH führte zu einer Inhibierung des Wachstums, welche aber durch adaptive Evolution wieder aufgehoben werden konnte. Die Deletion hatte jedoch nicht den gewünschten Effekt auf die Itaconatproduktion und die Wachstumskopplung. Aufgrund der Produktion von Citrat (ca. 0,3 mol/(mol Glucose)) reduzierte sich die Itaconatausbeute auf 0,2 mol/(mol Glucose). Die Ursache für die Citratproduktion konnte auch nach Sequenzierung der adaptierten Stämme nicht endgültig geklärt werden. Insgesamt verringerte sich der Fluss in den TCA-Zyklus somit weiter im Vergleich zu den adaptierten Stämmen von *ita23*. Eine Erhöhung des TCA-Zyklus-Flusses könnte möglicherweise durch eine Unterbrechung des Pentosephosphatweges erfolgen. Eine solche Intervention würde den Fluss über die Glykolyse zwingen. Ohne Itaconatproduktion ist der Fluss durch die Glykolyse jedoch begrenzt. Somit ist laut Modell nach der Deletion von G6PD (*zwf*) oder PGL (*pgl*) bereits eine schwache Kopplung zu erwarten. Weiterhin ist es jedoch wahrscheinlich, dass ein solcher KO einen signifikanten Effekt auf das Wachstum hat, da einer der verbleibenden Stoffwechselwege für die NADPH-Produktion inaktiviert würde. Somit kann NADPH nur noch durch die Transhydrogenase aus NADH

generiert werden. Es ist anzunehmen, dass hierfür die Expression der Transhydrogenase (*pntAB*) optimiert werden muss.

Eine andere Möglichkeit schnell die für eine hohe Produktivität benötigte Biomasse zu produzieren, bietet ein so genannter zweistufiger Prozess. Hierbei wird in der ersten Stufe die Biomasse generiert und in der folgenden zweiten Stufe das Produkt gebildet. Ein Stamm für einen solchen zweistufigen Prozess sollte in der ersten Stufe mit hoher Wachstumsrate, möglichst hoher Biomasseausbeute und unter Bildung geringer Mengen an Nebenprodukten wachsen können. Basierend auf dem Design von ita23 wurde ein Stamm ita32 mit funktionellen TCA-Zyklus (MG1655 *ΔaceA Δpta ΔpykA ΔpykF /pCadCs*) konstruiert, welcher bei 37 °C mit einer Wachstumsrate von 0,52 h⁻¹ wuchs, und neben Biomasse etwas Glutamat produzierte. Für die Itaconatproduktion in der zweiten Stufe, wurde nun ein genetischer Schalter benötigt, welcher eine dynamische Inaktivierung der Expression der Isocitratdehydrogenase und somit des TCA-Zyklus ermöglicht. Um den TCA-Zyklus dynamisch zu schalten, wurden die Lambda Promotoren (*p_R* und *p_L*) ausgewählt, welche durch den temperaturabhängigen Repressor CI857 reguliert werden. Diese wurden bereits erfolgreich für die Aktivierung der Expression des D-Laktatsyntheseweges eingesetzt (Zhou et al., 2012). Über diese Promotoren ist jedoch auch eine Inaktivierung der Genexpression möglich (Cho et al., 2012). Für die Optimierung von Bioprocessen wurde diese Richtung der Regulation bislang jedoch noch nicht berücksichtigt. Die Kontrolle der *icd*-Expression über die Lambda Promotoren im Wildtyp ermöglichte schnelles Wachstum bei 37 °C und schränkte das Wachstum bei 30 °C ein. Somit eignet sich der Schalter für einen zweistufigen Prozess, bei dem die Produktion bei niedriger Temperatur (≤ 30 °C) erfolgen soll. Nach Anpassung der Expressionstärke und der Kultivierungsbedingungen bei 37 °C war auch der dynamische Itaconatstamm (ita36A = MG1655 *ΔaceA Δpta ΔpykA ΔpykF ΔPicd:: cam_CI857_p_R /pCadCs*) in der Lage mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,53 h⁻¹ zu wachsen. Bei einer niedrigeren Temperatur von 28 °C zeigte der Stamm eine wachstumsgekoppelte Produktion von Itaconat mit einer Ausbeute von 0,69 mol/mol und einer Wachstumsrate von 0,12 h⁻¹. Bedingt durch die hohe Expressionstärke bei 37 °C ergab sich jedoch eine Umschaltzeit von der ersten Stufe (bei 37 °C) zur zweiten Stufe (bei 28 °C) von 12 Stunden. Die lange Umschaltzeit, welche auf einen langsamen Abbau der Proteine zurückzuführen ist, könnte durch die Verwendung von Abbautags oder durch Proteinmodifikation (Cho et al., 2012) reduziert werden. In dieser Arbeit wurde die Umschaltzeit als Wachstumsphase in den zweistufigen Prozess integriert. Die Prozessführung (einstufig oder zweistufig) unterschied sich somit nur durch die Wahl der Vorkulturbedingungen. Für die einstufige Kultivierung wurde die Vorkultur bei 28 °C inkubiert, wohingegen die Vorkultur für den zweistufigen Prozess bei 37 °C wuchs. Im Bioreaktor betrug die Temperatur für beide Prozesse 28 °C. Durch den zweistufigen Prozess mit ita36A erhöhte sich die volumetrische Produktivität um 22 % auf 0,39 g/l/h im Vergleich zum einstufigen Prozess und um 46 % im Vergleich zu ita23. Die maximale Produktivität konnte im Vergleich zu ita23 um 91 % erhöht werden. Ein weiterer Vorteil des Stammes ita36A

ist die Unabhängigkeit von Glutamat als zusätzliche C-Quelle und der hohe Titer des zweistufigen Prozesses von 46,9 g/l, welcher sich nah an dem minimalen Titer von 50 g/l bewegt, welcher für eine Kommerzialisierung von Bioprozessen empfohlen wird (Van Dien, 2013).

Die Produktivität wird wesentlich durch die Biomassekonzentration, die Glucoseaufnahmerate und die Produktausbeute beeinflusst. Die Biomassekonzentration kann im idealen zweistufigen Prozess durch die Dauer der ersten Stufe eingestellt werden. Im zweistufigen Prozess mit ita36A trug jedoch auch die zweite Stufe durch wachstumsgekoppelte Itaconatproduktion zur Biomassebildung bei. Dieses zusätzliche Wachstum muss bei der Berechnung der Umschaltzeit berücksichtigt werden. Sind höhere Biomassekonzentrationen erforderlich, so kann auch eine zusätzliche Phase bei 37 °C hinzugefügt werden. Vorher sollte jedoch über eine batch-Kultur bei 37 °C getestet werden, ob die gewünschte Biomassekonzentration unter den gegebenen Wachstumsbedingungen (Medienzusammensetzung, Begasung) realisiert werden kann. Die für eine gewünschte Produktivität benötigte Biomassekonzentration hängt von der Itaconatausbeute und der Glucoseaufnahmerate der zweiten Phase ab. Je niedriger diese sind, desto mehr Biomasse wird benötigt, was die Produktausbeute reduziert. Eine Erhöhung der Itaconatausbeute von ita36A könnte durch eine dynamische Expression der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PD, *zwf*) und der damit verbundenen Inhibierung des Pentosephosphatweges erreicht werden. Großes Potential birgt auch eine Optimierung der Glucoseaufnahmerate. Für die gesamte Feeding-Phase des zweistufigen Prozesses ergab sich nur eine niedrige Aufnahmerate von 0,85 mmol/g BTM/h. Hierzu trug besonders die stationäre Phase bei, in der sich die Glucoseaufnahmerate stetig reduzierte. Zum Vergleich: Die maximale Aufnahmerate von ita36A bei exponentiellem Wachstum betrug 4,67 mmol/g BTM/h (batch-Phase: 0-12,5 h). Vermutlich wird in der stationären Phase nur so viel Glucose aufgenommen, wie für die Generierung von Erhaltungsenergie (in Form von ATP) benötigt wird. Kürzlich wurde am Beispiel der Laktatproduktion mit *E. coli* gezeigt, dass unter dieser Annahme ein zweistufiger Prozess theoretisch schlechter abschneidet als ein einstufiger Prozess (Klamt et al., 2017a). Grund hierfür ist die deutlich höhere Glucoseaufnahmerate von 13,3 mmol/g BTM/h im einstufigen Prozess im Vergleich zur reduzierten Aufnahmerate von 3,9 mmol/g BTM/h in der stationären Phase des zweistufigen Prozesses. In der Studie wurde aber auch gezeigt, dass durch die Implementierung von Mechanismen, die zusätzliches ATP verbrauchen (ATP-Verschwendung) die Aufnahmerate in der zweiten Stufe erhöht werden kann, wodurch der zweistufige Prozess wieder eine deutlich höhere volumetrische Produktivität generiert als der einstufige Prozess. Mögliche ATP-Verschwendungsstrategien beinhalten die Expression der F1-Untereinheit der ATPase zur ATP-Hydrolyse (Koebsmann et al., 2002; Liu et al., 2016) oder die Verwendung von ATP-Substratzyklen (Hädicke et al., 2015). Generell sollte untersucht werden, welche Faktoren für den Eintritt in die stationäre Phase verantwortlich sind. So wirkt sich eine Stickstofflimitierung deutlich stärker auf die Glucoseaufnahmerate in der stationären Phase aus, als beispielsweise eine Magnesiumlimitierung (Chubukov and Sauer, 2014). Die relativ hohe Glucoseaufnahmerate unter Mg-Limitierung ist vermutlich auf eine Inhibierung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) und eine dadurch erhöhte intrazelluläre

Konzentration an PEP zurückzuführen. So konnte auch unter stickstofflimitierenden Bedingungen die Glucoseaufnahmerate durch eine reduzierte PDH-Aktivität und eine veränderte Stringent Response um einen Faktor 2,36 erhöht werden (Michalowski et al., 2017). Eine Inhibierung der PDH ist jedoch nur für Produkte ausgehend von Pyruvat geeignet. Auf die Itaconatproduktion würde sie sich vermutlich negativ auswirken, da nicht ausreichend Acetyl-CoA generiert würde. Für ita36A und auch ita23 wurde vermutet, dass das Wachstum durch die hohen Itaconatkonzentrationen (≥ 25 g/l) inhibiert wird. Um dies zu belegen, sollte das Wachstum der Stämme bei dieser Konzentration in einem Schüttelkolbenexperiment untersucht werden. Sollte tatsächlich eine Produktinhibierung vorliegen, so könnte diese möglicherweise durch adaptive Evolution abgeschwächt werden. Eine hohe Produkttoleranz ist essentiell, um hohe Titer zu erzielen, und somit die Downstream-Kosten zu senken (Van Dien, 2013). Alternativ könnte das Itaconat auch kontinuierlich (in situ) abgetrennt werden um die Anreicherung im Fermenter zu vermeiden. Hierfür müsste zellfreie Kulturbrühe aus dem Bioreaktor entnommen und der entsprechenden Aufreinigungsmethode zugeführt werden. Die itaconatfreie Lösung könnte dann nach der Extraktion wiederum in den Reaktor zurückgeführt werden. Dabei ist zu beachten, dass diese noch Teile des Extraktionsmittels enthalten kann, welche toxisch auf die Zellen wirken können (Kaur and Elst, 2014). Dies ist bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion der Fall, wo das Itaconat mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert wird. Eine Alternative stellt die Elektrodialyse dar, bei der geladene Komponenten selektiv aus der wässrigen Lösung abgetrennt werden können. Hierfür werden Ionenaustauschermembranen verwendet, welche nur eine bestimmte Ionensorte durchlassen. Somit können beispielsweise Glucose und Itaconat voneinander getrennt werden. Die Extraktionsausbeute ist jedoch geringer als bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Kuenz, 2008). Denkbar wäre aber auch eine weitere Umsetzung von Itaconat in andere (weniger toxische) Produkte. Chemisch kann Itaconat durch Decarboxylierung und anschließende Veresterung zu Methyl-methacrylat umgewandelt werden (Choi et al., 2015). Biochemisch existiert ein solcher Weg zwar nicht, aber durch die Veränderung der Substratspezifität von bereits vorhandenen Enzymen können auch synthetische (neuartige) Stoffwechselwege realisiert werden (Erb et al., 2017).

Für die Entwicklung eines kommerziellen Prozesses zur 1,4-Butandiolproduktion wurden die Aktivität und die Expression der einzelnen Stoffwechsellzyme optimiert. Die Verwendung von Antibiotika, einem zusätzlichen Kostenfaktor, wurde durch die Integration des Produktionsweges ins Genom vermieden (Burgard et al., 2016). Sowohl in ita23 als auch in ita36A erfolgte die Expression der cis-Aconitat-Decarboxylase und Citratsynthase über ein High-copy-Plasmid (pCadCs) mit einem Kanamycinresistenzgen. Nach einer Integration ins Genom würde in jeder Zelle jedoch nur eine Kopie der Produktionsgene vorliegen. Daher müsste der Integration vermutlich eine Anpassung der Expressions-/Translationsstärke durch Variation des Promotors oder der Ribosomenbindestelle (RBS) folgen. Die Erstellung größerer RBS-Bibliotheken ist beispielsweise durch Verwendung von CRISPR mit relativ wenig Aufwand möglich (Liang et al., 2017). Weiterhin sollte getestet werden, ob eine erhöhte

Expression und Aktivität weiterer essentieller Stoffwechsellzyme wie der Aconitase oder der PEP-Carboxylase sich positiv auf die Produktivität auswirken.

Nicht geklärt ist bislang, wie Itaconat überhaupt aus der Zelle transportiert wird. Besonders bei hohen Titern muss der Transport gegen einen großen Konzentrationsgradienten erfolgen. Eine Überexpression eines entsprechenden Transporters könnte den Export von Itaconat verbessern und somit möglicherweise auch die Produktivität und den Titer. Kandidaten für die Überexpression wären die Transporter von *A. terreus* (*MFS*) und *U. maydis* (*itp1*) (Geiser et al., 2016; Li et al., 2011). Der für den Transport von Itaconat in *E. coli* verantwortliche Transporter könnte möglicherweise durch vergleichende Expressionsanalyse vom Produktionsstamm ita23 mit dem Wildtypstamm ermittelt werden. Auf diese Weise wurde der Transporter für den Export von 1,5-Diaminopentan in *C. glutamicum* identifiziert (Kind et al., 2011). Durch Überexpression des Transporters konnten die Autoren die Ausbeute um 20 % und die spezifische Produktivität um 40 % steigern.

Neben Glucose kann *E. coli* auch weitere Kohlenstoffquellen direkt (Xylose, Glycerol) oder je nach Stammhintergrund nach Implementierung eines entsprechenden Abbauweges (Saccharose) verstoffwechseln. Für die Produktion mit *Aspergillus terreus* wird Melasse verwendet, welche vorwiegend aus Saccharose besteht. Der Itaconatüberproduzent ita23 enthält jedoch keine Enzyme für die Spaltung der Saccharose. Die Expression einer Invertase, entweder cytosolisch oder auf der Außenmembran lokalisiert, würde die Spaltung der Saccharose und die anschließende Aufnahme der Fructose und Glucose über die jeweiligen PTS-Transportsysteme ermöglichen (Lee et al., 2010; Ma et al., 2014). Damit würde das Designprinzip von ita23, welches die Produktion von Pyruvat über den PTS-Transporter beinhaltet, erhalten bleiben. Jedoch existieren nicht für alle Kohlenstoffquellen entsprechende PTS-Transporter. So wird beispielsweise Xylose entweder im Symport mit einem Proton oder unter Verbrauch von ATP in die Zelle aufgenommen (Luo et al., 2014). Das benötigte Acetyl-CoA könnte dann über das Malatenzym oder den Entner-Doudoroff-Weg generiert werden. Ausgehend von Xylulose-5-Phosphat existiert auch ein alternativer heterologer Weg, der die Aufspaltung des Flusses in die Itaconatvorstufen Oxalacetat und Acetyl-CoA ermöglicht. Hierbei handelt es sich um die Phosphoketolase (EC 4.1.2.9), welche Xylulose-5-phosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Acetylphosphat umwandelt. Für die Itaconatproduktion würde dann Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Oxalacetat und Acetylphosphat zu Acetyl-CoA verstoffwechselt. Die Verwendung des Phosphoketolaseweges hat zudem das Potential die Ausbeute zu erhöhen. So ist mit Xylose dann eine maximale Ausbeute von 0,97 statt 0,83 mol/mol und mit Glucose eine maximale Ausbeute von 1,2 statt 1 mol/mol möglich.

Anhang

Stoffwechselmodell des Zentralstoffwechsels von *E. coli*

Tabelle A1: Verwendetes Modell des Zentralstoffwechsels von *E. coli*, basierend auf dem Model von (Hädicke and Klamt, 2010). Hinzugefügt wurde die Bildung von Aconitat durch die Aconitase (ACN1), die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPP), die Glucoseaufnahmereaktion (GLC), die Glutamataufnahme/-abgabe (GLUT_EX), Itaconatsynthese und -export (ITASYN, ITA_EX) sowie der Pyruvatexport (PYR_EX). Die Reaktionen, welche erst während der Stammkonstruktion eingefügt wurden, sind orange hinterlegt. Reversible Reaktionen: „↔“, irreversibel: „→“.

Abkürzung	Enzym/Reaktion	
ACDH	Acetaldehyddehydrogenase	1 AcCoA + 1 NADH ↔ 1 Adh
ACK	Acetatkinase	1 AcP ↔ 1 ATP + 1 Ac
ACN1	Aconitase (Teilreaktion)	1 Cit ↔ 1 ACONT
ACN2	Aconitase (Teilreaktion)	1 ACONT ↔ 1 ICit
AC_EX	Acetatexport	1 Ac =
ADH	Alkoholdehydrogenase	1 NADH + 1 Adh ↔ 1 Eth
ADPGlc_Synth	ADPGlc-Synthese	1 G6P + 1 ATP → 1 ADPGlc
AKGDH	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	1 alKG → 1 SuccCoA + 1 NADH + 1 CO ₂
ATPASE	ATP-Synthase	3 H_ex ↔ 1 ATP
ATPmaint	ATP Maintenance	1 ATP →
Ala_Synth	Alaninsynthese	1 Pyr + 1 Glu → 1 alKG + 1 Ala
Arg_Synth	Argininsynthese	1 AcCoA + 4 ATP + 1 NADPH + 1 CO ₂ + 1 N + 1 Asp + 2 Glu → 1 alKG + 1 Fum + 1 Ac + 1 Arg
Asn_Synth_1	Asparaginsynthese	2 ATP + 1 N + 1 Asp → 1 Asn
Asp::AspSAld	Aspartatsemialdehydsynthese	1 ATP + 1 NADPH + 1 Asp → 1 AspSAld
AspSAld::HSer	Homoserinsynthese	1 NADPH + 1 AspSAld → 1 HSer
Asp_synth	Aspartatsynthese	1 OxA + 1 Glu → 1 alKG + 1 Asp
C14_0_FS_Synth	C14-Fettsäuresynthese	7 AcCoA + 6 ATP + 12 NADPH → 1 C14_0_FS
CDPEth_Synth	CDP-Ethanolaminsynthese	1 3PG + 3 ATP + 1 NADPH + 1 N → 1 NADH + 1 CDPEth
CMP_KDO_Synth	CMP-KDO-Synthese	1 PEP + 1 R5P + 2 ATP → 1 CMP_KDO
CO2_EX	CO ₂ -Export	1 CO ₂ →
CO2_UP	CO ₂ -Aufnahme	→ 1 CO ₂
CS	Citratsynthase	1 AcCoA + 1 OxA → 1 Cit
Chor_Synth	Chorismatsynthese	2 PEP + 1 E4P + 1 ATP + 1 NADPH → 1 Chor
Cys_Synth	Cysteinsynthese	1 AcCoA + 1 S + 1 Ser → 1 Ac + 1 Cys
ENO	Enolase	1 2PG ↔ 1 PEP
ETH_EX	Ethanolexport	1 Eth →

FBPA	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	1 F16P ↔ 1 DHAP + 1 G3P
FBPP	Fructose-1,6-bisphosphatase	1 F16P → 1 F6P
FORM_EX	Formiatexport	1 Form →
FUMA	Fumarase	1 Fum ↔ 1 Mal
FUMR	Fumaratreduktase	1 Fum + 1 QuiH2 → 1 Succ
G3PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogeanse	1 G3P ↔ 1 DPG + 1 NADH
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	1 G6P ↔ 1 D6PG + 1 NADPH
GLC	Glucoseaufnahme	→ 1 Glc
GLUT_EX	Glutamataufnahme/ -export	1 Glu ↔
GLY3DH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase	1 DHAP + 1 NADH → 1 Glyc3P
GND	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	1 PGluc → 1 R15P + 1 NADPH + 1 CO2
Gln_Synth	Glutaminsynthese	1 ATP + 1 N + 1 Glu → 1 Gln
Glu_synth	Glutamatsynthese	1 aKG + 1 NADPH + 1 N → 1 Glu
Gly_Synth	Glycinsynthese	1 Ser → 1 MTHF + 1 Gly
HEXOK	Hexokinase	1 ATP + 1 H_ex + 1 Glc → 1 G6P
His_Synth	Histidinsynthese	1 ATP + 1 PRPP + 1 Gln → 1 aKG + 2 NADH + 1 His
ICD	Isocitratdehydrogenase	1 ICit ↔ 1 aKG + 1 NADPH + 1 CO2
ICL	Isocitratlyase	1 ICit → 1 Succ + 1 Glyox
ITASYN	cis-Aconitat-Decarboxylase	1 ACONT → 1 CO2 + 1 ITA
ITA_EX	Itaconatexport	1 ITA →
Ile_Synth	Isoleucinsynthese	1 Pyr + 1 NADPH + 1 Glu + 1 Thr → 1 aKG + 1 CO2 + 1 N + 1 Ile
KDAL	2-Keto-3-deoxygluconat-6-phosphat-Aldolase	1 2KD6PG → 1 G3P + 1 Pyr
LAC_EX	Laktatexport	1 Lac →
LDH	Laktatdehydrogenase	1 Pyr + 1 NADH ↔ 1 Lac
Leu_Synth	Leucinsynthese	2 Pyr + 1 AcCoA + 1 NADPH + 1 Glu → 1 aKG + 1 NADH + 2 CO2 + 1 Leu
Lys_Synth	Lysinsynthese	1 di_am_pim → 1 CO2 + 1 Lys
MALE	Malatenzym	1 Mal → 1 Pyr + 1 NADH + 1 CO2
MALS	Malatsynthese	1 AcCoA + 1 Glyox → 1 Mal
MDH	Malatdehydrogenase	1 Mal ↔ 1 OxA + 1 NADH
MGS	Methylglyoxalweg	1 DHAP → 1 Lac
MTHF_Synth2	5,10-Methylentetrahydrofolat-Synthese	1 Gly ↔ 1 NADH + 1 CO2 + 1 N + 1 MTHF
Met_Synth	Methioninsynthese	1 SuccCoA + 1 MTHF + 1 HSer + 1 Cys → 1 Pyr + 1 Succ + 1 N + 1 Met
NADHDEHYDRO	NADH-Dehydrogenase	1 NADH ↔ 1 QuiH2 + 2 H_ex

NDPHep_Synth	NDP-Heptose-Synthese	1.5 G6P + 1 ATP → 4 NADPH + 1 NDPHep
N_UP	Stickstoffaufnahme	→ 1 N
O2_UP	Sauerstoffaufnahme	→ 1 O2
OH_myr_ac_Synth	Myristinsäuresynthese	7 AcCoA + 6 ATP + 11 NADPH → 1 OH_myr_ac
OXIDASE	Cytochromoxidase	1 QuiH2 + 0.5 O2 → 2 H_ex
PCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	1 OxA + 1 ATP → 1 PEP + 1 CO2
PDH	Pyruvatdehydrogenase	1 Pyr → 1 AcCoA + 1 NADH + 1 CO2
PFK	Phosphofruktokinase	1 F6P + 1 ATP → 1 F16P
PFL	Pyruvat-Formiat-Lyase	1 Pyr → 1 AcCoA + 1 Form
PGD	Phosphogluconatdehydratase	1 PGluc → 1 2KD6PG
PGI	Phosphoglucoisomerase	1 G6P ↔ 1 F6P
PGK	Phosphoglyceratkinase	1 DPG ↔ 1 3PG + 1 ATP
PGL	6-Phosphoglucono-Lactonase	1 D6PG → 1 D6PGC
PGM	Phosphoglucomutase	1 3PG ↔ 1 2PG
POX	Pyruvatoxidase	1 Pyr → 1 QuiH2 + 1 CO2 + 1 Ac
PPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase	1 PEP + 1 CO2 → 1 OxA
PPS	Phosphoenolpyruvatsynthase	1 Pyr + 2 ATP → 1 PEP
PRPP_Synth	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat-Synthese	1 R5P + 2 ATP → 1 PRPP
PTA	Phosphotransacetylase	1 AcCoA ↔ 1 AcP
PTS	Glucose-PTS-Transportsystem	1 PEP + 1 Glc → 1 G6P + 1 Pyr
PYK	Pyruvatkinase	1 PEP → 1 Pyr + 1 ATP
PYR_EX	Pyruvatexport	1 Pyr →
Phe_Synth	Phenylalaninsynthese	1 Chor + 1 Glu → 1 alKG + 1 CO2 + 1 Phe
Pro_Synth	Prolinsynthese	1 ATP + 2 NADPH + 1 Glu → 1 Pro
R5PI	Ribulosephosphat-3-Epimerase	1 R15P ↔ 1 X5P
RPI	Ribose-5-phosphat-Isomerase	1 R15P ↔ 1 R5P
SUCC_EX	Succinatexport	1 Succ →
SUCDH	Succinatdehydrogenase	1 Succ → 1 Fum + 1 QuiH2
SUCS	Succinyl-CoA-Synthetase	1 SuccCoA ↔ 1 Succ + 1 ATP
S_UP	Sulfataufnahme	4 ATP + 4 NADPH → 1 S
Ser_Synth	Serinsynthese	1 3PG + 1 Glu → 1 alKG + 1 NADH + 1 Ser
TAL	Transaldolase	1 G3P + 1 S7P ↔ 1 F6P + 1 E4P
TDPGlcS_Synth	TDP-Glucosamin-Synthese	1 F6P + 2 ATP + 1 N → 1 TDPGlcS
TK1	Transketolase 1	1 R5P + 1 X5P ↔ 1 G3P + 1 S7P
TK2	Transketolase 2	1 E4P + 1 X5P ↔ 1 F6P + 1 G3P
TPI	Triosephosphatisomerase	1 DHAP ↔ 1 G3P

TRANSHYDRO	Transhydrogenase	1 NADH + 1 H_ex ↔ 1 NADPH
Thr_Synth	Threoninsynthese	1 ATP + 1 HSer → 1 Thr
Trp_Synth	Tryptophansynthese	1 Chor + 1 PRPP + 1 Gln + 1 Ser → 1 G3P + 1 Pyr + 1 CO2 + 1 Glu + 1 Trp
Tyr_Synth	Tyrosinsynthese	1 Chor + 1 Glu → 1 aIKG + 1 NADH + 1 CO2 + 1 Tyr
UDPGlc_Synth	UDP-Glucose-Synthese	1 G6P + 1 ATP → 1 UDPGlc
UDP_NAG_Synth	UDP-Acetylglucosamin-Synthese	1 F6P + 1 AcCoA + 1 ATP + 1 Gln → 1 Glu + 1 UDP_NAG
UDP_NAM_Synth	UDP-N-Acetylmuraminsäure-Synthese	1 PEP + 1 NADPH + 1 UDP_NAG → 1 UDP_NAM
Val_Synth	Valinsynthese	2 Pyr + 1 NADPH + 1 Glu → 1 aIKG + 1 CO2 + 1 Val
dATP_Synth	dATP-Synthese	1 NADPH + 1 rATP → 1 dATP
dCTP_Synth	dCTP-Synthese	1 NADPH + 1 rCTP → 1 dCTP
dGTP_Synth	dGTP-Synthese	1 NADPH + 1 rGTP → 1 dGTP
dTTP_Synth	dTTP-Synthese	2 NADPH + 1 MTHF + 1 rUTP → 1 dTTP
di_am_pim_Synth	Diaminopimelinsäuresynthese	1 Pyr + 1 SuccCoA + 1 NADPH + 1 AspSald + 1 Glu → 1 aIKG + 1 Succ + 1 di_am_pim
mit_FS_Synth	Fettsäuresynthese	8.24 AcCoA + 7.24 ATP + 13.91 NADPH → 1 mit_FS
mue	Wachstumsrate	
rATP_Synth	rATP-Synthese	5 ATP + 1 CO2 + 1 PRPP + 2 MTHF + 2 Asp + 1 Gly + 2 Gln → 2 Fum + 1 NADPH + 2 Glu + 1 rATP
rCTP_Synth	rCTP-Synthese	1 ATP + 1 Gln + 1 rUTP → 1 Glu + 1 rCTP
rGTP_Synth	rGTP-Synthese	6 ATP + 1 CO2 + 1 PRPP + 2 MTHF + 1 Asp + 1 Gly + 3 Gln → 1 Fum + 1 NADH + 1 NADPH + 3 Glu + 1 rGTP
rUTP_Synth	rUTP-Synthese	4 ATP + 1 N + 1 PRPP + 1 Asp → 1 NADH + 1 rUTP

Benötigte Metabolite (in mmol) für die Synthese von 1 g Biotrockenmasse: 51,615 ATP, 0,024 dATP, 0,025 dGTP, 0,025 dCTP, 0,024 dTTP, 0,092 ADPGlc, 0,007 UDPGlc, 0,010 CDPEth, 0,010 OH_myrc, 0,010 C14_O_FS, 0,010 CMP_KDO, 0,010 NDPHep, 0,007 TDPGlcs, 0,142 Glyc3P, 0,380 Ser, 0,284 mit_FS, 0,601 Ala, 0,308 Glu, 0,017 UDP_NAG, 0,017 UDP_NAM, 0,017 di_am_pim, 0,101 Cys, 0,267 Asp, 0,205 Phe, 0,677 Gly, 0,105 His, 0,321 Ile, 0,379 Lys, 0,498 Leu, 0,170 Met, 0,267 Asn, 0,244 Pro, 0,291 Gln, 0,327 Arg, 0,280 Thr, 0,468 Val, 0,063 Trp, 0,152 Tyr, 0,149 rATP, 0,183 rGTP, 0,114 rCTP und 0,123 rUTP

Tabelle A2: Abkürzungen der Metabolite im Modell

Abkürzung	Metabolit
2KD6PG	2-Keto-3-deoxy-6-gluconat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
Ac	Acetat
AcCoA	Acetyl-CoA
ACONT	cis-Aconitat
AcP	Acetyl-P
Adh	Acetaldehyd
ADPGlc	ADP-Glucose
Ala	Alanin
alKG	α -Ketoglutarat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
AspSAld	Aspartat-4-semialdehyd
ATP	Adeonosintriphosphat
C14_0_FS	14:0 Fettsäure
CDPEth	CDP-Ethanolamin
Chor	Chorismat
Cit	Citrat
CMP_KDO	CMP_KDO
CO2	Kohlendioxid
Cys	Cystein
dATP	ATP für DNA-Synthese
dCTP	CTP für DNA-Synthese
eGTP	GTP für DNA-Synthese
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
Di_am_pim	Diaminopimelat
DPG	Diphosphoglycerat
D6PG	6-Phosphogluconolacton
D6PGC	6-Phosphogluconat
dTTP	TTP für DNA-Synthese
E4P	Erythrose-4-phosphat
Eth	Ethanol
F16P	Fructose-1,6-bisphosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
Form	Ameisensäure
Fum	Fumarat
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
Glyc3P	Glycerol-3-phosphat
Glyox	Glyoxylat
H_ex	Protonen aus dem Periplasma

His	Histidin
HSer	Homoserin
ICit	Isocitrat
Ile	Isoleucin
ITA	Itaconat
Lac	Laktat
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Mal	Malat
Met	Methionin
mit_FS	durchschnittliche Fettsäure
MTHF	Methylentetrahydrofolat
N	NH ₄
NADH	NADH
NADPH	NADPH
NDPHep	NDP-Heptose
O ₂	Sauerstoff
OH_myrist_ac	OH-Myristinsäure
OxA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
Pyr	Pyruvat
QuiH ₂	Ubiquinon
R5P	Ribose-5-phosphat
rATP	ATP für RNA-Synthese
rCTP	CTP für RNA-Synthese
rGTP	GTP für RNA-Synthese
RI5P	Ribulose-5-phosphat
rUTP	UTP für RNA-Synthese
S	SO ₄
S7P	Seduheptulose-7-phosphat
Ser	Serin
Succ	Succinat
SuccCoA	Succinyl-CoA
TDPGlc	TDP-Glucosamin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UDP_NAG	UDP-Acetylglucosamin
UDP_NAM	UDP-N-Acetylmuraninsäure
UDPGlc	UDP-Glucose
Val	Valin
X5P	Xylulose-5-phosphat

Tabelle A3: Ergebnisse der SNP-Analyse (Einzelnukleotid-Polymorphismus) von BJH30 und der adaptierten Stämme im Vergleich zum Referenzgenom (U00096.3). Die detektierte Veränderung trat in mindestens 89 % der Reads auf. Einzig der adaptierte Stamm BJH30 7.1 K1 unterschied sich durch ein unterbrochenes Citratsynthasegen von seinem Ursprungsstamm BJH30.

Stamm	Position	Referenz (MG1655)	Mutante	Aminosäureaustausch	Änderung der Funktion	Gen	Funktion
BJH30	257908	G	A	Lysin:: Arginin	Unbekannt	<i>erf</i>	RNA-Polymerase Holoenzym Assemblerungsfaktor
BJH30 7.1 K1	338636	G	A	Nein	Nein	<i>yahG</i>	Protein der inneren Membran
BJH30 7.2 K1	421688	G	T	Alanin::Serin	Unbekannt	<i>proY</i>	Proline H+ Symporter
BJH30 7.1 K1	753848	G	T	Cystein:: Stop	Inaktivierung	<i>glfA</i>	Citratsynthase
BJH30	889923	A	G	Kein Protein	Unbekannt	Promoter <i>ybjL/M</i>	Protein der inneren Membran
BJH30 7.1 K1	2173361	CC	-	Leserasterverschiebung	Unbekannt	<i>gatC</i>	Galactitol-PTS-Permease
BJH30 7.2 K1	2416870	T	G	Isoleucin:: Methionin	vom Knockout	<i>pta</i>	Phosphotransacetylase
	3354487	C	T	Kein Protein	Unbekannt	Promoter <i>glfB</i>	Untereinheit der Glutaminsynthase
	3453306	G	T	Kein Protein	Unbekannt	Promoter <i>rpsJ</i>	30S-Ribosomale Untereinheit S10
	3560456	-	G	Insertion Glycin	Unbekannt	<i>gfpR</i>	Repressor des Glycerol-3-phosphat Regulons
	4296381	-	CG	Leserasterverschiebung	Unbekannt	REP	Repetitives Element

Tabelle A4: Mutationen, die zusätzlich zu den in BJH30 bereits vorhandenen Mutationen (Tabelle A3) in den Stämmen ita23 5.2 K7, ita41, ita52 und ita52 op1 K8 detektiert wurden. In ita23 5.1 K8 wurden keine zusätzlichen Mutationen gefunden. Das Produktionsplasmid wurde in keinem der Stämme verändert.

Stamm	Position	Referenz (MG1655)	Mutante	Aminosäureaustausch	Änderung der Funktion	Gen	Funktion
ita23 5.2 K7	3966727	C	T	Cystein::Threonin		<i>rho</i>	Terminator der Transkription
ita41	240447-						
ita52	273964		Deletion		Inaktivierung	<i>ivY</i> , <i>frs</i> , <i>ApproAB</i> , ...	u.a. Prolinbiosynthese, Fettsäure β -Oxidation, DNA Polymerase IV, Fermentation-Respiration switch Protein
ita52 op1 K8						<i>ybcC</i>	
ita52 op1 K8	747812-		Deletion		Inaktivierung	<i>ybgDQPO</i> , <i>glfA</i> (teilweise)	potentielle fimbriale Proteine, Citratsynthese
	753708				Inaktivierung	<i>argD</i> (teilweise)	L-Ornithin/ L-Lysinbiosynthese
	3489469-		Deletion		Unbekannt	<i>argD</i>	L-Ornithin/ L-Lysinbiosynthese
	348969				Unbekannt	<i>asmA</i>	Beteiligt an Assembly der äußeren Membran
	3489711	T	C	Leserasterverschiebung			
	2140348-	ATCG	-		Unbekannt		
	2140351				Unbekannt	<i>argR</i>	Regulator der Argininbiosynthese
	3385016	C	T	Alamin::Valin	Unbekannt	<i>rriD</i>	5 S ribosomale RNA
	3423776	G	T		Unbekannt	<i>polA</i>	DNA-Polymerase I
	4048608	A	-	Leserasterverschiebung	Unbekannt		
ita52 op1 K8	2687191-		Deletion		Inaktivierung	<i>glnB</i>	Stickstoff regulatorisches Protein PII-I
	2687202						
	128525	A	C	Glutamat::Alamin	Unbekannt	<i>lpd</i>	Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes
	1477045	G	T	Arginin::Serin	Unbekannt	<i>ydbD</i>	putatives Methylglyoxalresistenzprotein
	4627323	A	-	Leserasterverschiebung	Unbekannt	<i>madR</i>	Reprimiert Gene der NAD-Synthese. Nicotinamid-Mononucleotid Adenylyltransferase

Tabelle A5: Modellvorgaben zur Berechnung des minimal benötigten PPW-Flusses durch Flussvariabilitätsanalyse. Die Raten [mmol/gBTM/h] deletierter Reaktionen sowie anderer Exportreaktionen (außer CO₂) wurden auf 0 gesetzt. Gleiches gilt für die Rate der Isocitratdehydrogenase, r_{GLC} = Glucoseaufnahmerate, r_{Ac} = Acetatbildungsrate, r_{Pyr} = Pyruvatbildungsrate, r_{Lac} = Laktatbildungsrate, r_{TCA} = Bildungsrate für Itaconat, Citrat und/oder cis-Aconitat, r_{ATPmain} = ATP-Bedarf für Erhaltungsstoffwechsel, r_{G6PD} = minimale Rate für die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Für r_{ATPmain} wurde im Vergleich zu den anderen Berechnungen die niedrigere Rate von 3,15 mmol/g BTM/h gewählt (vgl. (Orth et al., 2011)), da unter Berücksichtigung der anderen gemessenen Raten eine Rate von 8,39 mmol/g BTM/h nicht möglich war.

Stamm	gemessen							berechnet
	μ [h ⁻¹]	r_{GLC}	r_{ATPmain}	r_{Ac}	r_{TCA}	r_{Pyr}	r_{Lac}	r_{G6PD}
BJH30	0,09	1,47	3,15	0,35	0,23	0	0	≥ 3,04
BJH30 7.1 K1	0,24	4,82	3,15	0,39	0	5,35	0	≥ 2,77
BJH30 7.2 K1	0,21	4,57	3,15	0,41	0	4,88	0	≥ 3,73
ita52oP1	0,07	1,86	3,15	0,65	0	0,98	0,72	≥ 1,50
ita52 oP2	0,07	1,94	3,15	0,58	0	1,06	0,75	≥ 1,86
Ita52oP1_1.8_K1	0,21	4,22	3,15	0,67	0	2,36	0	≥ 8,41

Tabelle A6: Substrataufnahme- und Produktionsraten von ita36A im Bioreaktor nach der letzten Zufütterung von Glucose. Zur Berechnung der maximalen ATP-Produktionsrate wurde die Rate für die Erhaltungsenergie (r_{ATPmain} [mmol/g BTM/h]) durch FBA optimiert. Die Raten folgender Reaktionen wurden im Modell ausgeschaltet: PYK, PTA, ICL, SUCS, ICD, SUCC_EX, ETH_EX, FORM_EX und LAC_EX. Außerdem wurden die in der Tabelle aufgeführten gemessenen Raten [mmol/g BTM/h] für die Glucoseaufnahmerate (r_{GLC}), Acetatbildungsrate (r_{Ac}), Itaconatbildungsrate (r_{Ita}) und Pyruvatbildungsrate (r_{Pyr}) für die Berechnung berücksichtigt.

Prozessführung	Gemessen				berechnet
	r_{GLC}	r_{Ac}	r_{Ita}	r_{Pyr}	$r_{\text{ATPmain, max}}$
Einstufig	0,47	0,09	0,32	0	3,95
Zweistufig	0,34	0,10	0,20	0,05	2,71

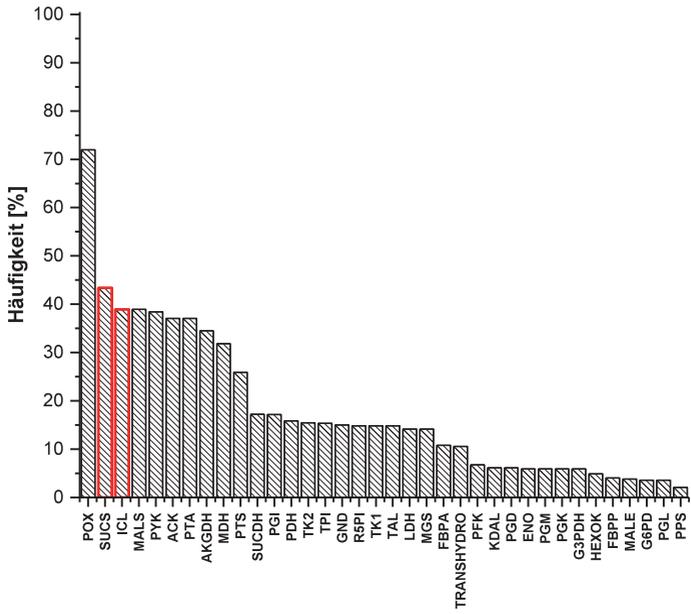


Abbildung A1: Reaktionsverteilung in den Cut Sets aus Iteration 1. Die implementierten KO sind rot umrandet.

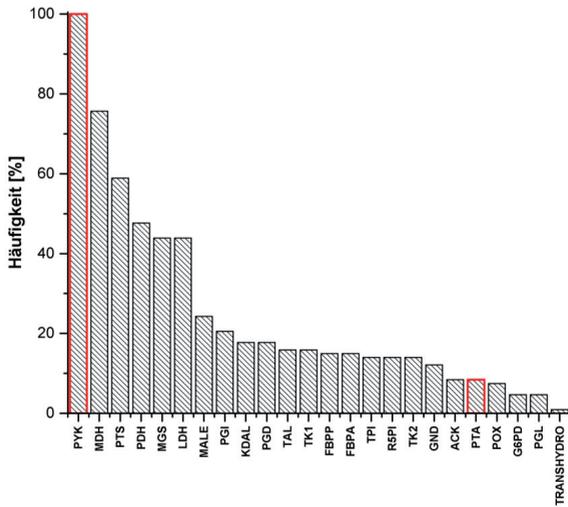


Abbildung A2: Reaktionsverteilung in Cut Sets aus Iteration 2. Die implementierten KO sind rot umrandet.

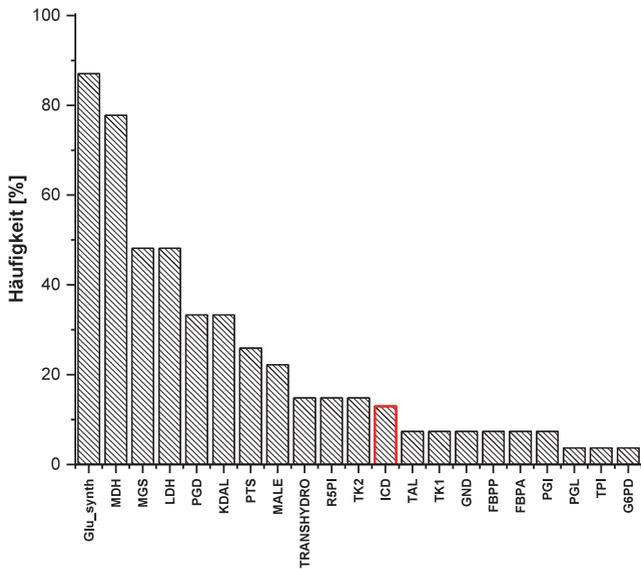


Abbildung A3: Reaktionsverteilung in Cut Sets Iteration 3. Der implementierte KO ist rot umrandet.

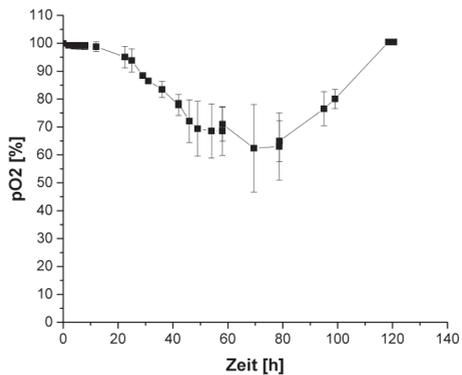


Abbildung A4: Zeitlicher Verlauf des Gelöstsauerstoffs (pO_2) der Bioreaktorkultivierung von ita23. Die Standardabweichung zweier unabhängiger Kultivierungen ist durch die Fehlerbalken gegeben.

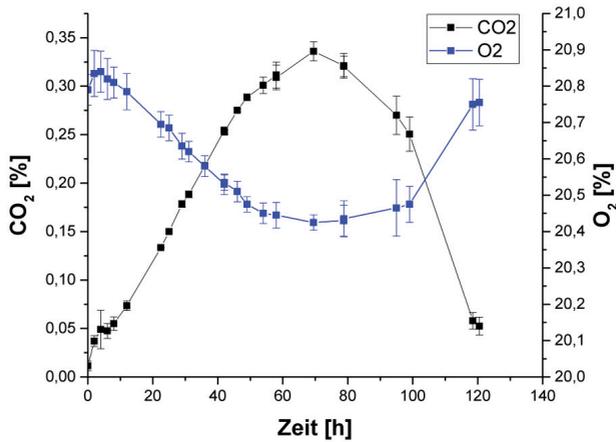


Abbildung A5: Abgaswerte für die Kultivierung von ita23 im Bioreaktor. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier unabhängiger Kultivierungen.

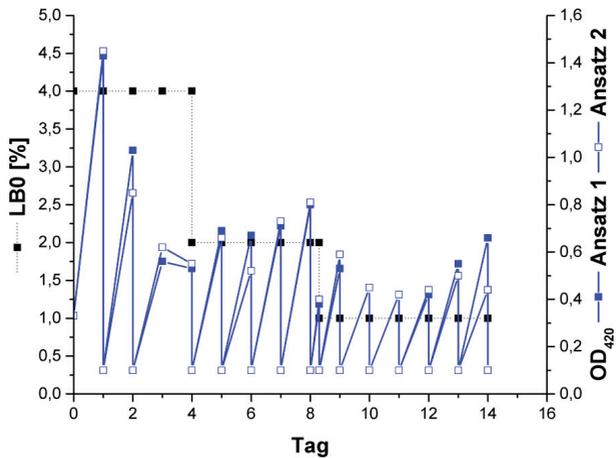


Abbildung A6: Adaption von ita41 bei 30 °C. Es wurden parallel zwei unabhängige Adoptionsansätze durchgeführt. Die Konzentration an LB₀ wurde dabei während der Adaption reduziert.

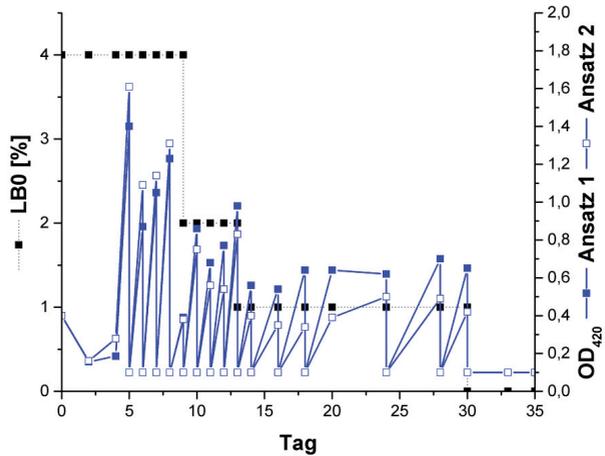


Abbildung A7: Adaption ita41 bei 37 °C. Es wurden zwei unabhängige Adaptionansätze durchgeführt. Die Konzentration an LB₀ wurde dabei während der Adaption reduziert. Aus dem Ansatz 2 wurden nach 16, 18 und 28 Tagen Stämme isoliert, welche in der Lage waren auf Minimalplatten zu wachsen.

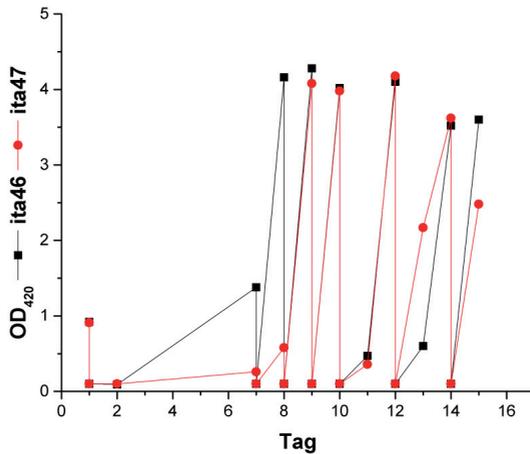


Abbildung A8: Adaptive Evolution von ita46 und ita47 bei 30 °C.

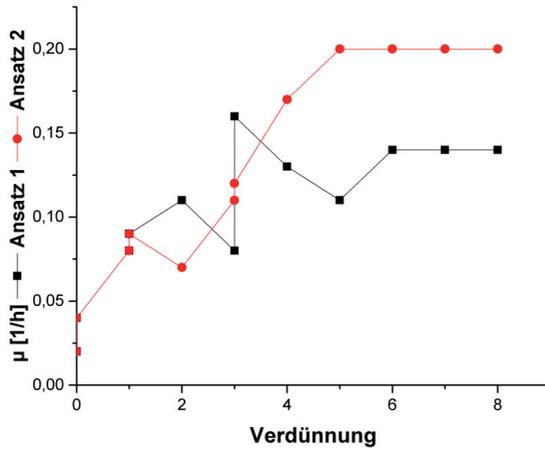


Abbildung A9: Adaption von ita52oP1 bei 30 °C. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt. Die Wachstumsrate wurde über zwei Messpunkte abgeschätzt.

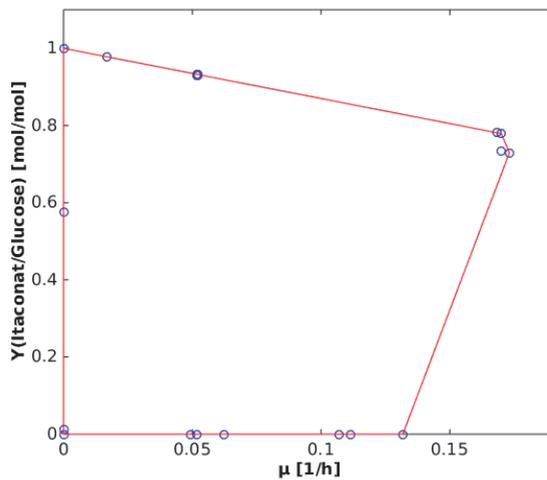


Abbildung A10: Trade-off-Diagramm der Wachstumsrate und Itaconatausbeute für BJH30 $\Delta m d h \Delta p g l$. Die blauen Punkte repräsentieren die elementaren Flussvektoren. Für die Berechnung wurden im Modell die Reaktionen PYK, PTA, ICL, SUCS, ICD, SUCC_EX, ETH_EX, FORM_EX, LAC_EX, MDH und PGL ausgeschaltet. Außerdem wurden $r_{GLC} \leq 10$ mmol/g BTM/h und $r_{ATP_{\text{maint}}} \geq 8,39$ mmol/g BTM/h vorgegeben.

Sequenz von pCadCs

Rot: Promotor BBa_J23100

Orange: Ribosomenbindestelle

Grün: cadA (cis-Aconitat-Decarboxylase, BAG49047.1)

Lila: Terminator

Hellblau: Kanamycinresistenzen

```
CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAAA
TCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCCTTATAAAATCA
AAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTC
GCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCTCTT
CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTT
GGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA AAAACGACGGCCAGTG
AGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAA
GGCCGCATGAATTCTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCGAA
TTCAGGAGGACAGCTATGACCAAACAGAGCGCAGATAGCAATGCAAAAAGC
GGTGTTACCAGCGAAATTTGTCATTGGGCAAGCAATCTGGCAACCGATGATA
TTCCGAGTGATGTTCTGGAAACGTGCCAAATATCTGATTCTGGATGGTATTGC
ATGTGCATGGGTTGGTGCACGTGTTCCGTGGTCAGAAAAATATGTTACAGGCA
ACCATGAGCTTTGAACCGCCTGGTGCATGTCGTGTTATTGGTTATGGCCAGA
AACTGGGTCCGGTTGCAGCAGCAATGACCAATAGCGCATTATTACAGGCCAC
CGAACTGGATGATTATCATAGCGAAGCACCGCTGCATAGCGCAAGCATTGTT
CTGCCTGCAGTTTTTGCAGCAAGCGAAGTTCTGGCAGAACAGGGTAAAACCA
TTAGCGGTATTGATGTTATTCTGGCAGCCATTGTTGGTTTTGAAAGCGGTCC
GCGTATTGGTAAAGCAATTTATGGTAGCGATCTGCTGAATAATGGTTGGCAT
TGTGGTGCAGTTTATGGTGCACCGGCAGGCGCACTGGCCACCGGTAAACTG
CTGGGTCTGACACCGGATAGCATGGAAGATGCACTGGGTATTGCCTGTACCC
AGGCATGTGGTCTGATGAGCGACAGTATGGTGGTATGGTTAAACGTGTTCA
GCATGGTTTTGCAACCCCGTAATGGTCTGCTGGGTGGCCTGCTGGCACATGGT
GGTTATGAAGCAATGAAAGGTGTGCTGGAACGTAGCTATGGTGGTTTTCTGA
AAATGTTTACAAAAGGCAATGGTCGTGAACCTCCGTATAAAGAAGAAGAAGT
TGTTGCAGGTCTGGGTAGCTTTTGGCATAACCTTTACCATTTCGCATTAACCTG
TATGCATGTTGTGGTCTGGTTCATGGTCCGGTGGAAAGCAATTGAAAACTGC
AGGGTCGTTATCCGGAACCTGCTGAATCGTGCAAATCTGAGCAATATTCGTCA
TGTTCATGTTACGTGAGCACCGCAAGCAATAGCCATTGCGGTTGGATTCCG
GAAGAACGTCCGATTAGCAGCATTGCAGGTGAGATGAGCGTTGCATATATTC
TGGCCGTTACAGCTGGTTGATCAGCAGTGTCTGCTGAGCCAGTTTAGCGAATT
TGATGATAACCTGGAACGTCCGGAAGTTTTGGGATCTGGCACGTA AAAGTTACC
AGCAGCCAGAGCGAAGAATTTGATCAGGATGGTAATTGTCTGAGCGCAGGT
CGTGTTTCGTATTGAATTTAATGATGGTTCAGCATTACCGAAAGCGTTGAAA
AACCGCTGGGTGTTAAAGAACCGATGCCGAATGAACGTATCCTGCATAAATA
```

TCGTACCCCTGGCAGGTAGCGTTACCGATGAAAGCCGTGTGAAAAGAAATTGAA
GATCTGGTCTCTGGGCTCTGGATCGTCTGACCGATATTAGTCCGCTGCTGGAAC
TGCTGAACTGTCCGGTAAAAGTCCGCTGGTTTAAAGGTACCAGGAGGACAGC
TATGTTTGAACGCGATATTGTTGCCACCGATAATAACAAAGCAGTTCTGCAT
TATCCGGGTGGTGAATTTGAAATGGATATCATTGAAGCCAGCGAAGGTAATA
ATGGTGTGTCTGGGTAATAATGCTGAGCGAAACCCGGTCTGATTACCTTTGA
TCCGGGTTATGTTAGCACCCGGTAGCACCGAAAAGTAAAATCACCTATATTGAT
GGTGATGCCGGTATTCTGCGTTATCGCGGTTATGATATTGCAGATCTGGCCG
AAAATGCCACCTTTAATGAAGTTAGTTACCTGCTGATTAACGGTGAACCTGCC
GACTCCGGATGAACTGCACAAATTTAACGATGAAATTCGCCATCATACCCTG
CTGGATGAAGATTTCAAAAGTCAGTTTAAACGTGTTTCCGCGTGATGCACATC
CGATGGCAACCCTGGCCAGCAGCGTTAATATTCTGAGCACCTATTATCAGGA
TCAGCTGAATCCGCTGGATGAGGCACAGCTGGATAAAGCAACCCTTCGTCTG
ATGGCAAAAGTTCCGATGCTGGCAGCATATGCACATCGTGCCCGTAAAGGTG
CACCGTATATGTATCCAGATAATAGCCTGAATGCCCGTGAACACTTTCTGCG
TATGATGTTTGGTTATCCGACCGAACCGTATGAAATTGATCCGATTATGGTG
AAAGCACTGGACAAACTGCTGATTCTGCATGCCGATCATGAACAGAATTGTA
GCACCAGCACCGTTTCGCATGATTGGTAGCGCACAGGCAAAATATGTTTGTAG
CATTGCCGGTGGTATTAATGCACTGAGTGGTCCGCTGCATGGTGGTGCAAAAT
CAGGCAGTTCTGGAATGCTGGAAGATATCAAATCAAATCATGGCCGGTGATG
CCACCGAGTTTATGAATAAAGTGAACAAACAAAGAGGATGGCGTCCGCCTGAT
GGGTTTTGGTCACTCGTGTATAAAAACTATGATCCGCGTGCCGCAATCGTT
AAAGAAACCCGACATGAAATTTCTGGAACATCTGGGTGGTATGATCTGTCTGG
ATCTGGCGATTAAACTGGAAGAAATTGCACTGGCAGATGACTATTTTTATCAG
CCGCAAACTGTATCCGAACGTGGATTTCTATACAGGTCTGATTTATCGTGCA
ATGGGCTTTCCGACCGATTTTTTACCCTGTTCTGTTTGAATTGGTCTGCTGCC
TGGTTGGATTGCACATTATCGTGAACAGCTGGGTGCAGCAGGCAATAAAATC
AATCGTCCGCGTCAGGTTTATACCGTAATGAAAGTCGTAACCTGTTTCCCTC
GTGAAGAACGTTAAGGATCCCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTC
GAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCTCT
AGACTGGGCCTCATGGGCCTTCCCTTACTGCCCGCTTTCAGTCCGGAAAC
CTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCCTGCGTATTGGG
CGCTCTCCGCTTCCCTCGTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGGTA
GCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
ACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGAC
CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCT
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCT
TATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCC
ACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTG

GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG
ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGA
TTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
AAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACA
GTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCAATACGCTGGCTATC
CGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAAACGATCCGCCCATTCGCCGCC
CAGTTCTTCCGCAATATCACGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCC
GCCACGCCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGTA AAAACGGCCATTTTCCA
CCATAATGTTCCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTACCACCAGATCTTCGCC
ATCCGGCATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCC
CTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCTGATCCACCAGGCCCGCTTCCATACGG
GTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAGGTGC
CCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTT
TTCTGCCGGCGCCAGATGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCC
CAGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTACCACATCCAGCACCGCCGC
ACACGGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTG
CAGCTCGTTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTACAAACAGCACCGGACGA
CCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCCGCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGC
TGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTACCCG
CATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGC
ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Literaturverzeichnis

- Apelblat, A., Manzurola, E., 1997. Solubilities of L-aspartic, DL-aspartic, DL-glutamic, p-hydroxybenzoic, o-anistic, p-anistic, and itaconic acids in water from T = 278 K to T = 345 K. *J Chem Thermodyn* 29, 1527-1533.
- Bailey, J. E., 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1675.
- Ballerstein, K., von Kamp, A., Klamt, S., Haus, U. U., 2012. Minimal cut sets in a metabolic network are elementary modes in a dual network. *Bioinformatics* 28, 381-387.
- Barton, N. R., Burgard, A. P., Burk, M. J., Crater, J. S., Osterhout, R. E., Pharkya, P., Steer, B. A., Sun, J., Trawick, J. D., Van Dien, S. J., Yang, T. H., Yim, H., 2015. An integrated biotechnology platform for developing sustainable chemical processes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 349-360.
- Baup, S., 1836. Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure, und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. *Ann Phar* 19, 29-38.
- Becker, J., Wittmann, C., 2015. Advanced Biotechnology: Metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and health-care products. *Angew Chem Int Ed* 54, 3328-3350.
- Beinert, H., Kennedy, M. C., Stout, C. D., 1996. Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem Rev* 96, 2335-2373.
- Bentley, R., Thiessen, C. P., 1955. Cis-aconitic decarboxylase. *Science* 122, 330.
- Bentley, R., Thiessen, C. P., 1957. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with C14-labeled substrates. *J Biol Chem* 226, 673-687.
- Berg, C. M., Rossi, J. J., 1974. Proline excretion and indirect suppression in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 118, 928-939.
- Berg, I. A., Filatova, L. V., Ivanovsky, R. N., 2002. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol Lett* 216, 49-54.
- BGR, Energiestudie 2016. www.bgr.bund.de, 2016.
- BIOCOM_AG, The German Biotechnology Sector. www.biotechnologie.de, 2017.
- Blangy, D., Buc, H., Monod, J., 1968. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 31, 13-35.
- Blazeck, J., Hill, A., Jamoussi, M., Pan, A., Miller, J., Alper, H. S., 2015. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for itaconic acid production. *Metab Eng* 32, 66-73.
- Blazeck, J., Miller, J., Pan, A., Gengler, J., Holden, C., Jamoussi, M., Alper, H. S., 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for itaconic acid production. *App Microbiol Biotechnol* 98, 8155-8164.

- Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A. M., Role, C., Beloeil, J. C., Ducrocq, C., 1995. Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J Bacteriol* 177, 3573-3578.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bukrinsky, M. I., Barsov, E. V., Shilov, A. A., 1988. Multicopy expression vector based on temperature-regulated *lac* repressor: Expression of human immunodeficiency virus *env* gene in *Escherichia coli*. *Gene* 70, 415-417.
- Burg, J. M., Cooper, C. B., Ye, Z., Reed, B. R., Moreb, E. A., Lynch, M. D., 2016. Large-scale bioprocess competitiveness: The potential of dynamic metabolic control in two-stage fermentations. *Curr Opin Chem Eng* 14, 121-136.
- Burgard, A., Burk, M. J., Osterhout, R., Van Dien, S., Yim, H., 2016. Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar. *Curr Opin Biotechnol* 42, 118-125.
- Burgard, A. P., Pharkya, P., Maranas, C. D., 2003. Optknock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol Bioeng* 84, 647-657.
- Calam, C. T., Oxford, A. E., Raistrick, H., 1939. Studies in the biochemistry of microorganisms: Itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus* Thom. *Biochem J* 33, 1488-1495.
- Causey, T. B., Zhou, S., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O., 2003. Engineering the metabolism of *Escherichia coli* W3110 for the conversion of sugar to redox-neutral and oxidized products: Homoacetate production. *Proc Natl Acad Sci* 100, 825-832.
- Chang, P., Chen, G. S., Chu, H. Y., Lu, K. W., Shen, C. R., 2017. Engineering efficient production of itaconic acid from diverse substrates in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 249, 73-81.
- Chen, C., Ding, S., Wang, D., Li, Z., Ye, Q., 2014. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava to succinic acid by *Escherichia coli* NZN111. *Bioresour Technol* 163, 100-105.
- Chen, M., Huang, X. N., Zhong, C. W., Li, J. J., Lu, X. F., 2016. Identification of an itaconic acid degrading pathway in itaconic acid producing *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 7541-7548.
- Chen, X., Alonso, A. P., Allen, D. K., Reed, J. L., Shachar-Hill, Y., 2011. Synergy between ¹³C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*. *Metab Eng* 13, 38-48.
- Cherepanov, P. P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.

- Cho, H.-S., Seo, S. W., Kim, Y. M., Jung, G. Y., Park, J. M., 2012. Engineering glycerladehyde-3-phosphate dehydrogenase for switching control of glycolysis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 109, 2612-2619.
- Choi, S., Song, C. W., Shin, J. H., Lee, S. Y., 2015. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab Eng* 28, 223-239.
- Chubukov, V., Sauer, U., 2014. Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *App Environ Microbiol* 80, 2901-2909.
- Cordes, T., Michelucci, A., Hiller, K., 2015. Itaconic Acid: The surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annu Rev Nutr* 35, 451-473.
- Cordes, T., Wallace, M., Michelucci, A., Divakaruni, A. S., Sapcariu, S. C., Sousa, C., Koseki, H., Cabrales, P., Murphy, A. N., Hiller, K., Metallo, C. M., 2016. Immunoresponsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. *J Biol Chem* 291, 14274-14284.
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* 97, 6640-6645.
- De Mey, M., Maertens, J., Boogmans, S., Soetaert, W. K., Vandamme, E. J., Cunin, R., Foulquié-Moreno, M. R., 2010. Promotor knock-in: A novel rational method for the fine tuning of genes. *BMC Biotechnol* 10, 26-34.
- Doudna, J. A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Dragosits, M., Mattanovich, D., 2013. Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories* 12, 64.
- DuPont_Tate_Lyle_Bio_Products_Company, www.duponttateandlyle.com/our_process 2016.
- Dwiarti, L., Yamane, K., Yamatani, H., Kahar, P., Okabe, M., 2002. Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *J Biosci Bioeng* 94, 29-33.
- Eikmanns, B. J. T.-S., Natalie; Eggeling, L.; Lüttke, K. U. and Sahn, R., 1994. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* 140, 1817-1828.
- Erb, T. J., Jones, P. R., Bar-Even, A., 2017. Synthetic metabolism: Metabolic engineering meets enzyme design. *Curr Opin Chem Biol* 37, 56-62.
- Erdrich, P., Steuer, R., Klamt, S., 2015. An algorithm for the reduction of genome-scale metabolic network models to meaningful core models. *BMC Syst Biol* 9, 48.
- Feist, A. M., Herrgard, M. J., Thiele, I., Reed, J. L., Palsson, B. O., 2009. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 7, 129-143.
- Fong, S. S., Burgard, A. P., Herring, C. D., Knight, E. M., Blattner, F. R., Maranas, C. D., Palsson, B. O., 2005. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnol Bioeng* 91, 643-648.

- Forster, A. H., Gescher, J., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Front Bioeng Biotechnol* 2, 1-12.
- Geiser, E., Przybilla, S. K., Friedrich, A., Buckel, W., Wierckx, N., Blank, L. M., Bolker, M., 2016. *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate. *Microb Biotechnol* 9, 116-126.
- Gupta, A., Reizman, I. M. B., Reisch, C. R., Prather, K. L. J., 2017. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. *Nat Biotechnol* 35, 273-279.
- Gyamerah, M., 1995a. Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *App Microbiol Biotechnol* 44, 356-361.
- Gyamerah, M. H., 1995b. Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 20-26.
- Haas, J. W., 2000. The Reverend Dr William Henry Dallinger, F.R.S. (1839-1909). *Notes Rec R Soc Lond* 54, 53-65.
- Hädicke, O., Bettenbrock, K., Klamt, S., 2015. Enforced ATP futile cycling increases specific productivity and yield of anaerobic lactate production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 112, 2195-2199.
- Hädicke, O., Klamt, S., 2010. CASOP: a computational approach for strain optimization aiming at high productivity. *J Biotechnol* 147, 88-101.
- Hädicke, O., Klamt, S., 2011. Computing complex metabolic intervention strategies using constrained minimal cut sets. *Metab Eng* 13, 204-213.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hansen, A. S. L., Lennen, R. M., Sonnenschein, N., Herrgard, M. J., 2017. Systems biology solutions for biochemical production challenges. *Curr Opin Biotechnol* 45, 85-91.
- Haskins, R. H., Thorn, J. A., Boothroyd, B., 1955. Biochemistry of the *Ustilaginales*: 11. Metabolic products of *Ustilago zeae* in submerged culture. *Can J Microbiol* 1, 749-756.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paep, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19-R19.14.
- Hevekerl, A., Kuenz, A., Vorlop, K. D., 2014a. Filamentous fungi in microtiter plates-an easy way to optimize itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 6983-6989.
- Hevekerl, A., Kuenz, A., Vorlop, K. D., 2014b. Influence of the pH on the itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 10005-10012.
- Hossain, A. H., Li, A., Brickwedde, A., Wilms, L., Caspers, M., Overkamp, K., Punt, P. J., 2016. Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact* 15, 130.

- Huang, C., Lu, X., Li, Y., Li, X., Li, J.-J., 2014. Improving itaconic acid production through genetic engineering of an industrial *Aspergillus terreus* strain. *Microb Cell Fact* 13, 119.
- Ibarra, R. U., Edwards, J. S., Palsson, B. O., 2002. *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature* 420, 186-189.
- Itaconix, Development of integrated production of polyitaconic acid from northeast hardwood biomass. National Institute of Food and Agriculture, 2009.
- Itaconix, Itaconix Plc (ITX) Investor Presentation. itaconix.com, 2017.
- Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P., Scrutton, M. C., 1991. The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J Gen Microbiol* 137, 533-539.
- Jensen, S. I., Lennen, R. M., Herrgard, M. J., Nielsen, A. T., 2015. Seven gene deletions in seven days: Fast generation of *Escherichia coli* strains tolerant to acetate and osmotic stress. *Sci Rep* 5, 1-10.
- Jeon, H. G., Cheong, D. E., Han, Y., Song, J. J., Choi, J. H., 2016. Itaconic acid production from glycerol using *Escherichia coli* harboring a random synonymous codon-substituted 5'-coding region variant of the *cadA* gene. *Biotechnol Bioeng* 113, 1504-1510.
- Jiang, W. Y., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, L. A., 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31, 233-239.
- Kanamasa, S., Dwiarti, L., Okabe, M., Park, E. Y., 2008. Cloning and functional characterization of the cis-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 80, 223-229.
- Kasahara, M., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., Shinagawa, H., 1991. Dual regulation of the *ugp* operon by phosphate and carbon starvation at two interspaced Promoters. *J Bacteriol* 173, 549-558.
- Kaur, G., Elst, K., 2014. Development of reactive extraction systems for itaconic acid: a step towards in situ product recovery for itaconic acid fermentation. *RSC Advances* 4, 45029-45039.
- Kim, B., Kim, W. J., Kim, D. I., Lee, S. Y., 2015. Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 339-348.
- Kim, J., Seo, H.-M., Bhatia, S. K., Song, H.-S., Kim, J.-H., Jeon, J.-M., Choi, K.-Y., Kim, W., Yoon, J.-J., Kim, Y.-G., Yang, Y.-H., 2017. Production of itaconate by whole-cell bioconversion of citrate mediated by expression of multiple cis-aconitate decarboxylase (*cadA*) genes in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 7, 1-9.
- Kind, S., Kreye, S., Wittmann, C., 2011. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* 13, 617-627.
- Kinoshita, K., 1932. Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim* 5, 271-287.

- Klamt, S., Gilles, E. D., 2004. Minimal cut sets in biochemical reaction networks. *Bioinformatics* 20, 226-234.
- Klamt, S., Hädicke, O., von Kamp, A., 2014. Stoichiometric and constraint-based analysis of biochemical reaction networks. In: Benner, P., Findeisen, R., Flockerzi, D., Reichl, U., Sundmacher, K., (Eds.), *Large-Scale Networks in Engineering and Life Sciences*. Springer International Publishing, Cham, pp. 263-316.
- Klamt, S., Mahadevan, R., 2015. On the feasibility of growth-coupled product synthesis in microbial strains. *Metab Eng* 30, 166-178.
- Klamt, S., Mahadevan, R., Hädicke, O., 2017a. When do two-stage processes outperform one-stage processes? *Biotechnol. J.* accepted.
- Klamt, S., Regensburger, G., Gerstl, M. P., Jungreuthmayer, C., Schuster, S., Mahadevan, R., Zanghellini, J., Muller, S., 2017b. From elementary flux modes to elementary flux vectors: Metabolic pathway analysis with arbitrary linear flux constraints. *PLoS Comput Biol* 13, e1005409.
- Klamt, S., Saez-Rodriguez, J., Gilles, E. D., 2007. Structural and functional analysis of cellular networks with *CellNetAnalyzer*. *BMC Syst Biol* 1, 2.
- Klement, T., Buchs, J., 2013. Itaconic acid-a biotechnological process in change. *Bioresour Technol* 135, 422-431.
- Koebmann, B. J., Westerhoff, H. V., Snoep, J. L., Nilsson, D., Jensen, P. R., 2002. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol* 184, 3909-3916.
- Krull, R., Wucherpfennig, T., Esfandabadi, M. E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D. C., Kampen, I., Kwade, A., Wittmann, C., 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* 163, 112-123.
- Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, A., Prusse, U., 2017. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 4063-4072.
- Kuenz, A., 2008. Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure. Fakultät für Lebenswissenschaften Technische Universität Braunschweig.
- Kuenz, A., Gallenmuller, Y., Willke, T., Vorlop, K. D., 2012. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 1209-1216.
- Lee, J. W., Choi, S., Park, J. H., Vickers, C. E., Nielsen, L. K., Lee, S. Y., 2010. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for L-threonine production. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 905-913.
- Lee, K. H., Park, J. H., Kim, T. Y., Kim, H. U., Lee, S. Y., 2007. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol* 3, 1-8.

- Lee, S. Y., Kim, H. U., 2015. Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nat Biotechnol* 33, 1061-1072.
- Levinson, W. E., Kurtzman, C. P., Kuo, T. M., 2006. Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. *Enzyme Microb Technol* 39, 824-827.
- Li, A., van Luijk, N., ter Beek, M., Caspers, M., Punt, P., van der Werf, M., 2011. A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. *Fungal Genet Biol* 48, 602-611.
- Li, A. P., N.; Zuiderdijk, R. and Punt, P., 2012. Enhanced itaconic acid production in *Aspergillus niger* using genetic modification and medium optimization. *BMC Biotechnol* 12, 1-9.
- Liang, L., Liu, R., Garst, A. D., Lee, T., Nogue, V. S. I., Beckham, G. T., Gill, R. T., 2017. CRISPR Enabled trackable genome engineering for isopropanol production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 41, 1-10.
- Lieb, M., 1966. Studies of heat-inducible lambda bacteriophage. I. Order of genetic sites and properties of mutant prophages. *J Mol Biol* 16, 149-163.
- Lin, H., Bennett, G. N., San, K. Y., 2005. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol Bioeng* 89, 148-156.
- Lin, Y. H., Li, Y. F., Huang, M. C., Tsai, Y. C., 2004. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Aspergillus terreus* to alleviate the effect of a short break in aeration during culture. *Biotechnol Lett* 26, 1067-1072.
- Liu, J., Kandasamy, V., Wurtz, A., Jensen, P. R., Solem, C., 2016. Stimulation of acetoin production in metabolically engineered *Lactococcus lactis* by increasing ATP demand. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 9509-9517.
- Love, C. A., Lilley Pe Fau - Dixon, N. E., Dixon, N. E., 1996. Stable high-copy-number bacteriophage lambda Promotor vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 176, 49-53.
- Luo, Y., Zhang, T., Wu, H., 2014. The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 32, 905-919.
- Ma, J., Li, F., Liu, R., Liang, L., Ji, Y., Wei, C., Jiang, M., Jia, H., Ouyang, P., 2014. Succinic acid production from sucrose and molasses by metabolically engineered *E. coli* using a cell surface display system. *Biochem Eng J* 91, 240-249.
- Maassen, N., Panakova, M., Wierckx, N., Geiser, E., Zimmermann, M., Bölder, M., Klinner, U., Blank, L. M., 2014. Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Eng Life Sci* 14, 129-134.
- Mahadevan, R., Schilling, C. H., 2003. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab Eng* 5, 264-276.

- Mahr, R., Frunzke, J., 2016. Transcription factor-based biosensors in biotechnology: Current state and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 79-90.
- Marvel, C. S., Shepherd, T. H., 1959. Polymerization reactions of itaconic acid and some of its derivatives. *J Org Chem* 24, 599-605.
- Max, B., Salgado, J. M., Rodriguez, N., Cortes, S., Converti, A., Dominguez, J. M., 2010. Biotechnological production of citric acid. *Braz J Microbiol* 41, 862-875.
- McGinness, K. E., Baker, T. A., Sauer, R. T., 2006. Engineering controllable protein degradation. *Mol Cell* 22, 701-707.
- Meyer, B. J., Maurer, R., Ptashne, M., 1980. Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage λ . *J. Mol. Biol* 139, 163-194.
- Michalowski, A., Siemann-Herzberg, M., Takors, R., 2017. *Escherichia coli* HGT: Engineered for high glucose throughput even under slowly growing or resting conditions. *Metab Eng* 40, 93-103.
- Michelucci, A., Cordes, T., Ghelfi, J., Pailot, A., Reiling, N., Goldmann, O., Binz, T., Wegner, A., Tallam, A., Rausell, A., Buttini, M., Linster, C. L., Medina, E., Balling, R., Hiller, K., 2013. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7820-7825.
- Morgunov, I., Srere, P. A., 1998. Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase - Substrate channeling of oxaloacetate. *J Biol Chem* 273, 29540-29544.
- Mosberg, J. A., Lajoie, M. J., Church, G. M., 2010. Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. *Genetics* 186, 791-799.
- Na, D., Yoo, S. M., Chung, H., Park, H., Park, J. H., Lee, S. Y., 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nat Biotechnol* 31, 170-174.
- Nakamura, C. E., Whited, G. M., 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14, 454-459.
- Nakashima, N., Tamura, T., 2013. Gene silencing in *Escherichia coli* using antisense RNAs expressed from doxycycline-inducible vectors. *Lett Appl Microbiol* 56, 436-442.
- Nubel, R. C., Ratajak, E. J., 1962. Process for producing itaconic acid. Pfizer & Co. US Patent 3044941.
- OECD, Statistical Definition of Biotechnology. www.oecd.org, 2005.
- Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O., 1991. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl Environ Microbiol* 57, 893-900.
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., Park, E. Y., 2009. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 597-606.

- Okamoto, S., Chin, T., Hiratsuka, K., Aso, Y., Tanaka, Y., Takahashi, T., Ohara, H., 2014. Production of itaconic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* 60, 191-197.
- Olano, J., Arriaga, D., Bustio, F., Soler, J., 1995. Kinetics and thermostability of NADP-isocitrate dehydrogenase from *Cephalosporium acremonium*. *App Environ Microbiol* 61, 2326-2334.
- Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M., Palsson, B. O., 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism-2011. *Mol Syst Biol* 7, 1-9.
- Orth, J. D., Thiele, I., Palsson, B. O., 2010. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol* 28, 245-248.
- Otten, A., Brocker, M., Bott, M., 2015. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of itaconate. *Metab Eng* 30, 156-165.
- Park, S., Chang, K. S., Jin, E., Pack, S. P., Lee, J., 2013. Oxaloacetate and malate production in engineered *Escherichia coli* by expression of codon-optimized phosphoenolpyruvate carboxylase2 gene from *Dunaliella salina*. *Bioprocess Biosyst Eng* 36, 127-131.
- Price, N. D., Papin, J. A., Schilling, C. H., Palsson, B. O., 2003. Genome-scale microbial in silico models: The constraints-based approach. *Trends Biotechnol* 21, 162-169.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., Lim, W. A., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152, 1173-1183.
- Rau, M. H., Calero, P., Lennen, R. M., Long, K. S., Nielsen, A. T., 2016. Genome-wide *Escherichia coli* stress response and improved tolerance towards industrially relevant chemicals. *Microb Cell Fact* 15, 176.
- Sakai, A., Kusumoto, A., Kiso, Y., Furuya, E., 2004. Itaconate reduces visceral fat by inhibiting fructose 2,6-bisphosphate synthesis in rat liver. *Nutrition* 20, 997-1002.
- Schuster, S., Hilgetag, C., 1994. On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *J Biol Syst* 2, 165-182.
- Shen, C. R., Lan, E. I., Dekishima, Y., Baez, A., Cho, K. M., Liao, J. C., 2011. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 77, 2905-2915.
- Soma, Y., Tsuruno, K., Wada, M., Yokota, A., Hanai, T., 2014. Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch. *Metab Eng* 23, 175-184.
- Song, C. W., Kim, D. I., Choi, S., Jang, J. W., Sang Yup, L., 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid. *Biotechnol Bioeng* 110, 2025-2034.
- Spektrum, *Escherichia coli*. www.spektrum.de, 1999.

- Steiger, M. G., Punt, P. J., Ram, A. F., Mattanovich, D., Sauer, M., 2016. Characterizing MttA as a mitochondrial cis-aconitic acid transporter by metabolic engineering. *Metab Eng* 35, 95-104.
- Strelko, C. L., Lu, W. Y., Dufort, F. J., Seyfried, T. N., Chiles, T. C., Rabinowitz, J. D., Roberts, M. F., 2011. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc* 133, 16386-16389.
- Taga, M. E., Bassler, B. L., 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 14549-14554.
- Tanaka, S., Lerner, S. A., Lin, E. C., 1967. Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J Bacteriol* 93, 642-648.
- Tepper, N., Shlomi, T., 2010. Predicting metabolic engineering knockout strategies for chemical production: accounting for competing pathways. *Bioinformatics* 26, 536-543.
- Tevž, G., Benčina, M., Legiša, M., 2010. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1657-1664.
- Thomason, L. C., Costantino, N., Court, D. L., 2007. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr Prot Mol Biol* 1, 17.11-17.18.
- Toya, Y., Ishii, N., Nakahigashi, K., Hirasawa, T., Soga, T., Tomita, M., Shimizu, K., 2010. ¹³C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its *pyk* and *pgi* gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. *Biotechnol Prog* 26, 975-992.
- Trinh, C. T., Carlson, R., Wlaschin, A., Sreenc, F., 2006. Design, construction and performance of the most efficient biomass producing *E. coli* bacterium. *Metab Eng* 8, 628-638.
- Trinh, C. T., Unrean, P., Sreenc, F., 2008. Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *App Environ Microbiol* 74, 3634-3643.
- Tufvesson, P., Fu, W. J., Jensen, J. S., Woodley, J. M., 2010. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod Process* 88, 3-11.
- Underwood, S. A., Buszko, M. L., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O., 2002. Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *App Environ Microbiol* 68, 1071-1081.
- UniProt, P0A6D0 (ARGR_ECOLI). www.uniprot.org, 2017a.
- UniProt, P0A9P0 (DLDH_ECOLI). www.uniprot.org, 2017b.
- Urbanczik, R., 2007. Enumerating constrained elementary flux vectors of metabolic networks. *IET Syst Biol* 1, 274-279.
- Van Dien, S., 2013. From the first drop to the first truckload: Commercialization of microbial processes for renewable chemicals. *Curr Opin Biotechnol* 24, 1061-1068.

- VCI, Die deutsche chemische Industrie 2030 - Update 2015/2016 mit Alternativszenarien. www.vci.de, 2017a.
- VCI, Rohstoffbasis der chemischen Industrie. www.vci.de, 2017b.
- Veit, A., Polen, T., Wendisch, V. F., 2007. Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 406-421.
- Venayak, N., Anesiadis, N., Cluett, W. R., Mahadevan, R., 2015. Engineering metabolism through dynamic control. *Curr Opin Biotechnol* 34, 142-152.
- von Kamp, A., Klamt, S., 2014. Enumeration of smallest intervention strategies in genome-scale metabolic networks. *PLoS Comput Biol* 10, 1-13.
- von Kamp, A., Klamt, S., 2017. Growth-coupled overproduction is feasible for almost all metabolites in five major production organisms. *Nat Commun* 8, 1-10.
- Vuoristo, K. S., Mars, A. E., Sangra, J. V., Springer, J., Eggink, G., Sanders, J. P., Weusthuis, R. A., 2015a. Metabolic engineering of itaconate production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 221-228.
- Vuoristo, K. S., Mars, A. E., Sangra, J. V., Springer, J., Eggink, G., Sanders, J. P., Weusthuis, R. A., 2015b. Metabolic engineering of the mixed-acid fermentation pathway of *Escherichia coli* for anaerobic production of glutamate and itaconate. *AMB Express* 5, 61.
- Weastra, WP 8.1 Determination of market potential for selected platform chemicals: Itaconic acid, succinic acid, 2,5-furandicarboxylic acid. BioConSept funded by the 7th Framework Programme of the European Union, 2013.
- Werpy, T., Petersen, G., 2004. Top value added chemicals from biomass: Volume I-results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. U.S. Department of Energy 1, 1-66.
- Williams, J. O., Roche, T. E., Mcfadden, B. A., 1971. Mechanism of action of isocitrate lyase from *Pseudomonas Indigofera*. *Biochemistry* 10, 1384-1390.
- Willke, T., Vorlop, K. D., 2001. Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 289-295.
- Yahiro, K., Takahama, T., Park, Y. S., Okabe, M., 1995. Breeding of *Aspergillus terreus* mutant Tn-484 for itaconic acid production with high-yield. *J Ferment Bioeng* 79, 506-508.
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J. D., Osterhout, R. E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H. B., Andrae, S., Yang, T. H., Lee, S. Y., Burk, M. J., Van Dien, S., 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol* 7, 445-452.
- Ying, H. X., He, X., Li, Y., Chen, K. Q., Ouyang, P. K., 2014. Optimization of culture conditions for enhanced lysine production using engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 172, 3835-3843.

- Zhang, X., Tervo, C. J., Reed, J. L., 2016. Metabolic assessment of *E. coli* as a biofactory for commercial products. *Metab Eng* 35, 64-74.
- Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O., 2011. L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 77, 427-434.
- Zhao, D. D., Yuan, S. L., Xiong, B., Sun, H. N., Ye, L. J., Li, J., Zhang, X. L., Bi, C. H., 2016. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microb Cell Fact* 15, 205.
- Zhou, L., Deng, C., Cui, W.-J., Liu, Z.-M., Zhou, Z.-M., 2015. Efficient L-alanine production by a thermo-regulated switch in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 178, 324-337.
- Zhou, L., Niu, D.-D., Tian, K.-M., Chen, X.-Z., Prior, B. A., Shen, W., Shi, G.-Y., Singh, S., Wang, Z.-X., 2012. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 14, 560-568.
- Zhu, Y., Eiteman, M. A., DeWitt, K., Altman, E., 2007. Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 73, 456-464.
- Zhuang, K., Yang, L., Cluett, W. R., Mahadevan, R., 2013. Dynamic strain scanning optimization: An efficient strain design strategy for balanced yield, titer, and productivity. *DySScO strategy for strain design. Bmc Biotechnol* 13, 13.
- Zhuang, Q. Q., Wang, Q., Liang, Q. F., Qi, Q. S., 2014. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-length monomers via the reversed fatty acid beta-oxidation cycle in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 24, 78-86.

