

Abschlussbericht Max-Buchner-Forschungsprojekt 2816: Neues Verfahren zur fermentativen Herstellung von 1,5-Diaminopentan

Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt wurde von Frau Stefanie Kind das Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* durch moderne Technologien der Systembiotechnologie zielgerichtet zu einem maßgeschneiderten Produktionsstamm für die fermentative Herstellung von 1,5-Diaminopentan (DAP) optimiert, der bereits in Schüttelkolben eine molare Produktausbeute von etwa 30 % erreicht (Abb. 1). Dabei wurden quantitative Omics-Analysen, systemweite Modellierung des metabolischen Netzwerkes sowie gezielte genetische Modifikation für die wissensbasierte Optimierung gekoppelt. Das Diamin stellt als Baustein für Biopolyamide eine Plattformchemikalie mit enormem Zukunftspotential dar. Frau Kind wurde für ihre im Folgenden zusammengefassten, wegweisenden Arbeiten 2010 als erste Europäerin mit dem internationalen Young Metabolic Engineer Award ausgezeichnet.

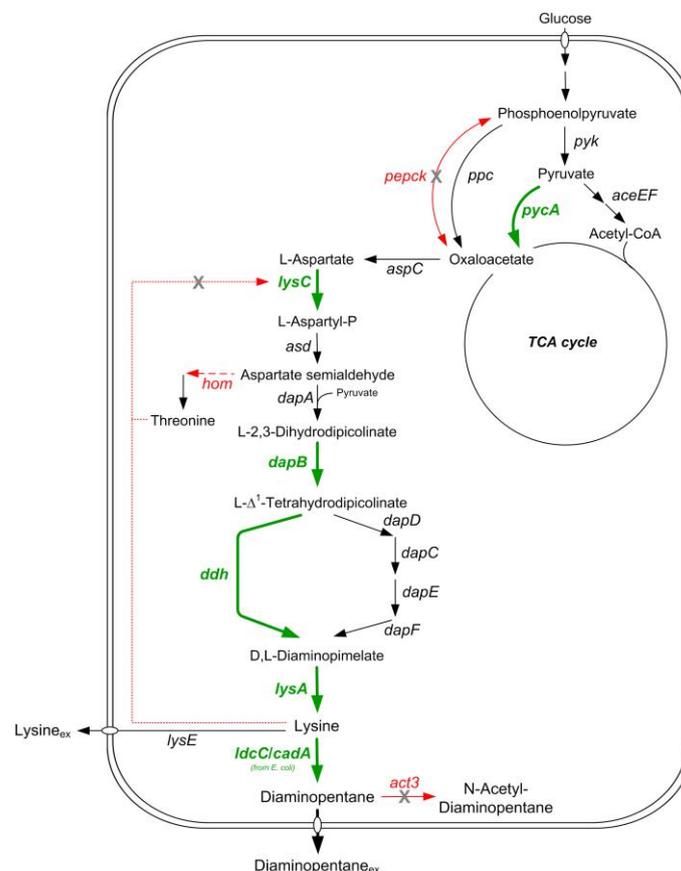


Abb. 1: Systembiotechnologische Optimierung von *C. glutamicum* zu einem maßgeschneiderten Produktionsstamm für die biobasierte Produktion von 1,5-Diaminopentan.

Hintergrund und Ergebnisse

Im Zentrum der Arbeiten stand zunächst die vielversprechende Strategie zur Produktion von DAP über eine Erweiterung des Lysinsyntheseweges, bei der über Decarboxylierung von Lysin in einem einzigen zusätzlichen Schritt das Zielprodukt DAP erhalten werden kann.

- Dies war der Ausgangspunkt der Stammoptimierung, die sowohl molekularbiologische Techniken als auch moderne „Omics“-Methoden einsetzte und im Folgenden erläutert ist. In ersten Schritten wurde der Lysin-produzierende Stamm *C. glutamicum lysC^{fabr}* (Kim et al. 2006) durch zusätzliche heterologe Expression einer Lysindecarboxylase zur DAP-Synthese befähigt. Es stellte sich durch vergleichende Arbeiten mit den Genen *ldcC* und *cadA* aus *E. coli* heraus, die beide über episomale Plasmide exprimiert wurden, dass die Lysindecarboxylase LcdC besonders geeignet ist, vermutlich aufgrund ihres besser mit dem Cytoplasma kompatiblen pH-Optimum. Dieses Enzym wurde dann in den weiteren Arbeiten berücksichtigt.
- Darauf aufbauend wurde mit LcdC eine genomische Überexpression in *C. glutamicum* vorgenommen, da die Plasmid codierte Überexpression wegen der notwendigen Zugabe von Antibiotika zur Selektion und der fehlenden Möglichkeit, mehrere Gene zu modifizieren, nicht geeignet für die tatsächliche Stammoptimierung ist. Hier konnte durch die Verwendung von starken Promotoren wie P_{EFTU} (Becker et al. 2007) in Kombination mit Codon-Optimierung der Gensequenz in *C. glutamicum* eine deutlich gesteigerte Expression erreicht werden.
- Es wurde zunächst eine Reihe von genetischen Targets aus dem Zentralstoffwechsel implementiert, die eine verbesserte Effizienz der Lysin-Synthese sowie der Bereitstellung von Produktbausteinen ermöglichten. Damit konnte in mehreren Schritten ein Stamm hergestellt werden, der bereits eine Ausbeute von 20 % (mol/mol) auf Glucose erreicht. Durch zusätzliche Medienoptimierung konnte dies sogar auf 30 % gesteigert werden. Damit stellt der im Projekt hergestellte Stamm den besten bislang bekannten Produktionsorganismus für DAP dar (Kind et al. 2010 a).

An dieser Stelle setzte der Schwerpunkt des vorliegenden Projektes von Frau Kind an, das sich mit der weitergehenden Optimierung von Schlüsselstellen im Metabolismus für eine gesteigerte Produktion befasste.

- Die erzeugten Mutanten wurden dazu detailliert auf ihre Produktionseigenschaften hin in Kultivierungsversuchen charakterisiert. Als wesentliches Ergebnis konnte mit N-Acetyl-DAP ein bislang unbekanntes unerwünschtes Nebenprodukt identifiziert werden, welches etwa 20 % des gesamt gebildeten Produktes ausmacht. Die Identifikation und Deletion der Stoffwechselwege für die Bildung von N-Acetyl-DAP stellt eine Schlüsselmodifikation für die effiziente DAP-Produktion dar. Mit Hilfe genomischer Analysen sowie systembiologischer

Ansätze wurde die entsprechende Reaktion identifiziert. In einer weiteren Runde wurde dann durch gezielte Deletion ein verbesserter Stamm (Second Generation Strain) hergestellt. Dadurch konnte erstmals eine vollständige Vermeidung der Nebenproduktbildung erreicht werden (Kind et al. 2010 b).

- In weiterführenden Arbeiten wurde der zelluläre Produktexport untersucht, ein relevanter Schritt der Produktion, da intrazellulär vorliegendes DAP als Endprodukt die Lysindecaboxylase zur DAP-Synthese inhibiert. Mit Hilfe vergleichender Transkriptomics konnte eine Permease als neues Target identifiziert werden, deren Expressionslevel unter DAP-Bildung deutlich anstieg. Die Deletion senkte die DAP-Bildung um etwa 90 %, was die Bedeutung des Transportproteins für die Produktion unterstreicht. In einem weiteren Zyklus der Stammoptimierung konnte dann der Exporter genomisch überexprimiert werden (Third Generation Strain), was zu einer deutlichen Steigerung von Produktausbeute und spezifischer Produktbildungsrate führte (Kind et al., 2011).

Literaturverzeichnis

Becker J, Klopprogge C, Herold A, Zelder O, Bolten CJ, Wittmann C (2007) Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* -over expression and modification of G6P dehydrogenase. J Biotechnol 132:99-109.

Kim HM, Heinzle E, Wittmann C (2006) Deregulation of aspartokinase by single nucleotide exchange leads to global flux rearrangement in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. J Microbiol Biotechnol 16:1174-1179.

Kind S, Jeong WK, Schröder H, Wittmann C (2010a) Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diamino-pentane. Metab Eng: 12:341-351.

Kind S, Jeong W K, Schröder H, Zelder O, Wittmann C (2010b) Identification and elimination of the competing N-acetyldiamino-pentane pathway for improved production of diamino-pentane by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 76:5175-5180.

Kind S, Kreye S, Wittmann C (2011) Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diamino-pentane in *Corynebacterium glutamicum*. Metab. Eng. In press.