

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22274> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Li, A.

Title: Itaconic acid production in *Aspergillus*

Issue Date: 2013-11-20

Samenvatting

Itaconzuur (methyleen barnsteenzuur) is een wit kristallijn onverzadigd C5 dicarbonzuur. Vanwege zijn specifieke gunstige eigenschappen en de unieke structuur, wordt itaconzuur gebruikt als monomeer of co-monomeer bij de vervaardiging van kunststoffen, harsen, synthetische vezels, verf, surfactants en elastomeren etc. Daarnaast werd itaconzuur door het US Department of Energy in 2004 gekozen als één van de 12 chemische bouwstenen die het meest interessant zijn om te worden geproduceerd via industriële biotechnologie. Momenteel wordt itaconzuur commercieel geproduceerd door *Aspergillus terreus* via schimmel fermentatie. Door de beperkte beschikbaarheid is het gebruik van itaconzuur gelimiteerd. Om de hoeveelheid geproduceerde itaconzuur te verhogen en economisch beschikbaar maken, is *Aspergillus niger* gekozen als de productie gastheerstam vanwege de flexibiliteit als een productieplatform. *A. niger* (één van de zwarte aspergilli) heeft een lange traditie van veilig gebruik (Schuster et al. 2002) voor de productie van enzymen en organische zuren. *A. niger* wordt op grote schaal toegepast in de biotechnologie als gastheer voor de productie van voedingsingrediënten, geneesmiddelen en industriële enzymen. Bovendien accumuleert *A. niger* organische zuren op uiteenlopende substraten onder verschillende omstandigheden. Het is verder van belang dat *A. niger* grote hoeveelheden citroenzuur (360 g/L) produceert, omdat deze verbinding in *A. terreus* een uitgangsstof is in de biosynthese van itaconzuur. Dit proefschrift beschrijft het onderzoek dat is uitgevoerd naar de productie van itaconzuur in *A. niger* en illustreert onderzoeksbenaderingen voor de productie van organische zuren in schimmels in het algemeen.

Studies op het terrein van metabole routes voor organische zuur productie door schimmels tonen aan dat de belangrijkste commerciële producten ofwel het resultaat zijn van eenvoudige oxidatie van een monosaccharide of tussenproducten óf derivaten zijn van de citroenzuur (TCA) cyclus. **Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de industriële productie van organische zuren, in het bijzonder di, tri-carbonzuren in schimmels. Sommige van deze organische zuren zoals citroenzuur en gluconzuur zijn reeds jarenlang gecommercialiseerd. Voor anderen bestaan er mogelijkheden om ze ook via industriële biobased processen te produceren. Om die reden worden bestaande of potentiële metabole routes voor elk organisch zuur beschreven tezamen met de belangrijkste enzymen en hun coderende genen. Bovendien wordt de huidige stand van zaken op het gebied van kennis van relevante organische zuur

transporters in schimmels, productiemedia en -omstandigheden in dit hoofdstuk samengevat.

A. niger die wordt toegepast voor itaconzuur productie in deze studie, is niet van nature een itaconzuur producent. De genen die coderen voor enzymen betrokken bij itaconzuur productie, zijn afkomstig van een natuurlijke itaconzuur produceerder, *A. terreus*. Als startpunt voor het identificeren van de essentiële genen in de biosynthese van itaconzuur, wordt in hoofdstuk 2 een kloon gebaseerde transcriptomics benadering beschreven. Van een aantal op verschillende wijze gecontroleerde *A. terreus* batch fermentaties, werden dié culturen geselecteerd voor mRNA isolatie, die het grootste verschil in itaconzuur titer en productiviteit lieten zien. In een kloon gebaseerd microarray experiment werden klonen geïdentificeerd die de sterkste (> 10-voudige toename) differentiële hybridisatiesignalen te zien gaven. Eén van de klonen bevatte een (gedeeltelijk) gen van de MmgE-PrpD familie. Via heterologe expressie in *E. coli* werd aangetoond dat het volledige coderende gebied van dit gen codeert voor een cis-aconitaat decarboxylase. Expressie van dit gen in *A. niger*, resulteerde in itaconzuur productie. Genoom analyse suggereert dat in *A. terreus* het cis-aconitaat decarboxylase gen onderdeel is van een itaconzuur gerelateerd gen cluster, dat ook genen bevat die coderen voor twee specifieke transporters en een 'Zinc finger' regulator eiwit.

Om het productieniveau van itaconzuur in *A. niger* te vergroten, werd het onderzoek verder gericht op stamverbetering en het optimaliseren van cultuurmedia. In hoofdstuk 3 werden op basis van onderzoek beschreven in hoofdstuk 2 en het onderzoek van andere groepen, twee genen - *gpdA* coderend voor glycerinaldehyde-3-fosfaat dehydrogenase (GPD) en *hbd1* coderend voor een flavohemoglobine domein (HBD) - geselecteerd voor overexpressie in *A. niger*. Bovendien werden nieuwe media ontwikkeld gebaseerd op een referentie medium voor *A. terreus*. Om grote aantallen culturen te kunnen analyseren, ontwikkelden we een aanpak voor het screenen van schimmel transformanten en verschillende media in 96-well micro-titer platen. Hoewel de prestaties van GPD en HBD transformanten ten opzichte van hun ouderstam niet verbeterde onder de geteste groeiomstandigheden, werd aangetoond dat koper (Cu^{2+}) positief correleerde met de verbeterde itaconzuur productie. Verrassend is dat de omstandigheden voor het optimaliseren van itaconzuur productie duidelijk verschillen van de omstandigheden die optimaal zijn voor de productie van citroenzuur en oxaalzuur.

Zoals beschreven in de transcriptomics studie in hoofdstuk 2, worden *cadA* (gen coderend voor cis-aconitaat decarboxylase) en *mttA* (gen coderend voor een 'mitochondrial carrier protein') 'up' gereguleerd tijdens itaconzuur productieomstandigheden. Genoom analyse suggereert

dat in *A. terreus* de *cadA* en *mttA* genen onderdeel zijn van een itaconzuur gerelateerd gen cluster. Een interessant gen *mfsA* (coderend voor een mogelijke dicarboxylaat carrier) bleek geclusterd met *cadA* en *mttA* en is mogelijk ook gerelateerd aan itaconzuur productie. Het *mttA* gen codeert voor een eiwit dat mogelijk functioneert als transporter van tri-carbonzuren uit mitochondria en het *mfsA* gen codeert voor een eiwit dat mogelijk betrokken is bij het transport van dicarbonzuren uit de cel. In hoofdstuk 4, wordt aangetoond dat de itaconzuur productie wordt verbeterd na individuele expressie van deze twee potentiële transporter genen in *A. niger*. De productie werd echter niet verder verbeterd wanneer *mttA* en *mfsA* beide tot expressie werden gebracht in CAD 10.1, een *A. niger cadA* transformant. Uit ons onderzoek bleek verder dat oxaalzuur accumuleerde oxaalzuur bijproduct. Om itaconzuur productie te verhogen en de vorming van bijproduct te elimineren, werden twee nieuwe productie gastheren, i.e. D15#26 (een niet verzurende stam) en de *oahA* deletiestam AB 1.13 $\Delta oahA$ #76 (geen oxaalzuur productie), getest voor het verbeteren van itaconzuur productie. Terwijl de expressie van het *cadA* gen in D15#26 geen toename van itaconzuur productie liet zien, leidde de expressie van *cadA* in AB 1.13 $\Delta oahA$ #76 tot vergelijkbare hoeveelheden itaconzuur als in de *mttA* en *mfsA* transformanten. Bovendien accumuleerde de transformant $\Delta oahA$ #76 CAD5 een grotere hoeveelheid aan citroenzuur, wat beschouwd kan worden als een voordeel bij het gebruik van deze stam voor de verdere ontwikkeling richting de verbetering van itaconzuur productie.

De studie werd uitgebreid met de analyse van verbeterde gastheerstammen en fermentatie omstandigheden. Een andere verbeterde citroenzuur gastheerstam *A. niger* stam ATCC 1015 N201 werd geïntroduceerd als een nieuwe productie gastheerstam. De geselecteerde *cadA* transformant van N201 en de eerder ontwikkelde stam HBD 2.5, die een schimmel hemoglobine domein (*hbd1*) tot overexpressie brengt, werden getest bij verschillende concentraties van opgelost zuurstof (D.O., ‘dissolved oxygen’) in het medium. Hieruit blijkt dat een verlaagde concentratie aan opgeloste zuurstof, een positieve invloed heeft op itaconzuur productie in *A. niger* stammen. Dit resultaat viel samen met de waarneming dat overexpressie van een schimmel hemoglobine domein in *A. niger* leidde tot een verbeterde itaconzuur productie onder gecontroleerde groeiomstandigheden bij lage D.O. niveaus. De meest gunstigste D.O. voor het produceren van itaconzuur was circa 10% -20% . Vervanging van de lab stam AB 1.13 CAD met de industriële organisch zuur producerende stam N201 CAD verhoogde het niveau van itaconzuur productie. Bovenstaande resultaten geven ons nieuwe inzichten voor de verbetering van itaconzuur productie in *A. niger*.

Itaconic acid production in Aspergillus

In **hoofdstuk 5** , wordt bij wijze van demonstratie van de laatste stap van een bio-based itaconzuur productie, een nieuwe downstream recovery procedure geëxploreerd, waarbij *A. terreus* als een model stam werd gebruikt. Dit hoofdstuk beschrijft voorbereidend onderzoek om de biotechnologische productie van itaconzuur te integreren met ‘in stream product recovery’ (ISPR). Extractie met oplosmiddelen werd gekozen uit de huidige belangrijkste technieken voor het terugwinnen van itaconzuur met behulp van 2-methyl tetrahydrofuraan (2m-THF) als extractiemiddel.