



## From Waste to Value –

### Bio-Nylon Monomers from Renewables using *Corynebacterium glutamicum*

Nele Buschke



**ibvt-Schriftenreihe**

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik  
der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

**Band 71**

**Cuvillier-Verlag  
Göttingen, Deutschland**



Herausgeber  
Prof. Dr. Christoph Wittmann  
Institut für Bioverfahrenstechnik  
TU Braunschweig  
Gaußstraße 17, 38106 Braunschweig  
www.ibvt.de

**Hinweis:** Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

### **Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek**

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

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2013

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2013

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2013

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-95404-457-3

ISSN 1431-7230



From Waste to Value –  
Bio-Nylon Monomers from Renewables using  
*Corynebacterium glutamicum*

Von der Fakultät für Maschinenbau  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde  
einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biotechnol. Nele Buschke  
aus Aachen

eingereicht am: 22.02.2013

mündliche Prüfung am: 31.05.2013

Prüfungsvorsitzender: Prof. Garnweitner

1. Referent: Prof. Dr. Christoph Wittmann

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

3. Referent: Prof. Dr. Rainer Krull

2013



## Publications

Partial results of this work have been published in advance. This was authorized by the Institute of Biochemical Engineering represented by Prof. Dr. Christoph Wittmann.

### Peer-reviewed articles

Becker, J., **Buschke, N.**, Bücken, R., Wittmann, C., 2010. Systems level engineering of *Corynebacterium glutamicum* - Reprogramming translational efficiency for superior production. *Eng. Life Sci.* 10, 430 - 438.

**Buschke, N.**, Schröder, H., Wittmann, C., 2011. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose. *Biotechnol. J.* 6, 306 - 317.

**Buschke, N.**, Schäfer, R., Becker, J., Wittmann, C., 2013. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – Optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresour. Technol.*, 135: 544 - 554.

**Buschke, N.**, Becker, J., Schäfer, R., Biedendiek, R., Kiefer, P., Wittmann, C., 2013. Systems metabolic engineering of xylose utilizing *Corynebacterium glutamicum* for Production of Diaminopentane. *Biotechnol. J.*, 8:557 - 570.

### Conference contributions

Kind, S., **Buschke, N.**, Becker, J., Schröder, H., Wittmann, C., Biotechnological production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum* for biobased-polyamides. ProcessNet, 2010, Frankfurt, Germany.

**Buschke, N.**, Schröder, H., Wittmann, C., Hemicellulose for Production of the Biopolyamide Monomer 1,5-Diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. VAAM-Jahrestagung, 2011, Karlsruhe, Germany.

**Buschke, N.**, Schröder, H., Wittmann, C., Extension of the value chain towards biopolyamides - novel two step process for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose. European Congress of Applied Biotechnology, 2011, Berlin, Germany.



**Buschke, N.**, Kind, S., Becker, J., Schröder, H., Wittmann, C., Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of bio-nylon from renewable resources. World Congress on Industrial Biotechnology & Bioprocessing, 2012, Orlando, USA.

### **Master and diploma students**

Partial results were determined in collaboration with students during the following master and diploma thesis and are mentioned at the appropriate place.

André Langlhofer, 2010, Synthetische Biotechnologie – Diaminopentanproduktion mit *Corynebacterium glutamicum* aus Xylose, durchgeführt am Institut für Bioverfahrenstechnik.

Ingo Tesche, 2012, Untersuchung industrieller Reststoffe für die biotechnologische Produktion von 1,5-Diaminopentan, durchgeführt am Institut für Bioverfahrenstechnik.



## Vorwort

Bei Prof. Dr. Christoph Wittmann bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Referats und der Betreuung während meiner Doktorarbeit. Ich habe dich als Doktorvater immer sehr geschätzt. Deine große Geduld und Unterstützung, vor allem beim Korrigieren, war für mich persönlich eine sehr große Hilfe. Für die Möglichkeit mich auf Tagungen im In- und Ausland zu beweisen und meine Präsentationsfähigkeiten zu verbessern möchte ich mich auch sehr herzlich bedanken. Du hattest immer ein offenes Ohr und das habe ich immer als sehr positiv empfunden. Vielen Dank für den Satz „Alles wird gut“!

Prof. Dieter Jahn und Prof. Garnweitner danke ich für die Übernahme des Korreferats und des Prüfungsvorsitzes und das Interesse an meiner Arbeit. Ich möchte mich außerdem bei Prof. Krull bedanken, für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft bei meiner Prüfung teilzunehmen.

Bei Judith Becker möchte ich mich für die stets sehr gute und nette Zusammenarbeit bedanken. Von der Diplomarbeit bis zum Abschluss dieser Arbeit hast du mich begleitet und mich dabei immer geduldig und mit deinem Wissen unterstützt. Dafür vielen Dank.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei der BASF für die intensive Zusammenarbeit zu Beginn dieses Projekts. Insbesondere möchte ich mich Hartwig Schröder, Gregory von Abendroth und Oskar Zelder bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung im Projekt “Biobasierte Polyamide durch Fermentation“ (No. 0315239A).

Bei den anderen Projektpartnern der Initiative Bioindustrie21, der Daimler AG, der Fischerwerke GmbH, der Robert Bosch GmbH und der BIOPRO Baden-Württemberg GmbH bedanke ich mich für die interessante Zusammenarbeit.



Dr. Patrick Kiefer von der ETH Zürich danke ich für die Unterstützung bei der Analyse der CoA-Ester. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Rebekka Biedendiek für die Unterstützung bei der Microarray-Analyse.

Ich bedanke mich recht herzlich bei den technischen Mitarbeitern des Instituts für Bioverfahrenstechnik, Cord Hullmann, Yvonne Göcke, Sandra Hübner, Elena Kempf und Theresa Namuth für die großartige Unterstützung im Labor.

Meinen Studenten André Langlhofer, Mara Neddersen, Holger Bolze, Ingo Tesche, Magdalena Steinfeldt, Iman Kattan und Anna Biermann danke ich für ihre unterstützende Arbeit.

Bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Bioverfahrenstechnik, die mich in der ganzen Zeit am Institut begleitet und nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht meine Zeit am Institut bereichert haben bedanke ich mich sehr. Insbesondere möchte ich Danke sagen bei Stefanie Kind, Rudolf Schäfer und Claudia Korneli.

Bei meinen Bürokolleginnen Sarah Heine und Diana Rahmsdorf sage ich Danke für die stets angenehme Büroatmosphäre.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für die moralische Unterstützung und Rückenstärkung während der letzten Jahre. Ihr habt mich nicht oft zu Gesicht bekommen und seid dennoch immer für mich da gewesen. Danke!

Bei dir, Johannes, bedanke ich mich für dein großartiges Verständnis, wenn ich wieder ein Wochenende mit meiner Arbeit verbrachte. Mit deiner aufmunternden Art gelang es dir immer wieder mich anzuspornen wenn mich die Motivation verließ. Für den notwendigen Rückhalt und die erforderliche Ablenkung danke ich dir.



## Table of Contents

Summary .....	XI
Zusammenfassung .....	XIII
1 Introduction.....	1
2 Objectives.....	3
3 Theoretical Background.....	4
3.1 Feedstocks for biorefinery applications.....	4
3.1.1 Structure and properties of lignocellulose.....	5
3.1.2 Lignocellulose processing – Extraction and saccharification .....	8
3.1.3 Black liquor – a high potential waste from pulp and paper industry .....	9
3.1.4 Inhibitors from industrial raw materials .....	10
3.2 <i>Corynebacterium glutamicum</i> as industrial working horse.....	11
3.2.1 History – Becoming a platform organism .....	11
3.2.2 Central carbon pathways .....	12
3.2.3 Natural substrate spectrum.....	12
3.2.4 Metabolic engineering for growth on pentoses .....	14
3.3 Bio-based polyamides .....	14
3.4 1,5-Diaminopentane bio-synthesis in <i>C. glutamicum</i> .....	16
4 Material and Methods .....	19
4.1 Strains and Plasmids.....	19
4.2 Chemicals.....	21
4.3 Growth Media .....	21
4.4 Cultivation.....	22
4.4.1 Cultivation in shake flasks .....	22
4.4.2 Fed-batch fermentation.....	23



4.5 Genetic engineering.....	23
4.5.1 Isolation of nucleic acids.....	23
4.5.2 Polymerase chain reaction .....	24
4.5.3 Strain construction .....	24
4.5.4 Codon optimization.....	25
4.6 Analytical techniques.....	25
4.6.1 Quantification of cell concentration.....	25
4.6.2 Substrate and product analysis .....	26
4.6.3 Quantification of total organic carbon .....	27
4.7 Enzymatic activity measurement .....	27
4.7.1 Preparation of cellular extracts .....	27
4.7.2 Quantification of protein concentration .....	27
4.7.3 Xylose isomerase .....	28
4.7.4 Xylulokinase .....	28
4.7.5 Isocitrate dehydrogenase .....	28
4.7.6 Fructose 1,6-bisphosphatase .....	28
4.7.7 Glucose 6-phosphate dehydrogenase.....	29
4.8 Preparation of hemicellulose substrates.....	29
4.8.1 Extraction of hemicellulose from black liquor.....	29
4.8.2 Hydrolysis into bioavailable sugars.....	30
4.9 Metabolomics .....	31
4.9.1 Extraction of intracellular CoA esters.....	31
4.9.2 Intracellular CoA ester analysis .....	31
4.10 Transcriptomics .....	31
4.10.1 RNA sampling and extraction .....	31
4.10.2 Microarray analysis.....	32
4.11 Fluxomics .....	32



4.11.1 Computation of elementary flux modes .....	32
4.11.2 Mass isotopomer labeling analysis of all proteins and secreted products.....	33
4.11.3 Metabolic flux calculation.....	34
5 Results and Discussion .....	35
5.1 Systems metabolic engineering of <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	35
5.1.1 Extension of the substrate spectrum of <i>C. glutamicum</i> to xylose.....	35
5.1.2 Growth of <i>C. glutamicum</i> DAP-Xyl1 on xylose and glucose .....	36
5.1.3 Limited xylose uptake can be attributed to inefficient xylose import .....	38
5.1.4 Less efficient DAP production by DAP-Xyl1 on xylose than on glucose .....	39
5.1.5 Intracellular fluxes in xylose and glucose utilizing cells.....	40
5.1.6 Transcript changes in xylose utilizing <i>C. glutamicum</i> .....	44
5.1.7 Transcriptional activation of the methyl citrate cycle on xylose.....	48
5.1.8 Integrated analysis of in vivo and in silico fluxes .....	49
5.1.9 Rational strain design by integrated transcriptome analysis.....	49
5.1.10 Improved DAP production by engineered <i>C. glutamicum</i> strain Xyl2.....	50
5.1.11 The metabolic flux network of <i>C. glutamicum</i> is highly flexible. ....	51
5.1.12 The impact of xylose utilization on the pyruvate metabolism .....	53
5.1.13 Unknown regulatory interactions in <i>C. glutamicum</i> .....	53
5.1.14 The trehalose metabolism seems imbalanced on xylose.....	55
5.1.15 DAP production from xylose by genome integration of xylAB.....	55
5.2 Bioprocess engineering for application of lignocellulosic substrates .....	57
5.2.1 Enzymatic hydrolysis of hemicellulose enables a potent fermentation substrate..	57
5.2.2 Growth and production on hemicellulose hydrolysate.....	59
5.2.3 Hemicellulose is a promising new feedstock in biotechnology.....	60
5.2.4 Extraction of fermentable sugars from black liquor.....	61
5.2.5 Impact of black liquor toxins on growth performance of <i>C. glutamicum</i> .....	62
5.2.6 Bio-production of diaminopentane from black liquor hydrolysate.....	63
5.2.7 The novel strain DAP-Xyl2 performs well during fed-batch fermentation.....	65



6 Conclusions and outlook.....	67
7 Abbreviations and symbols.....	69
8 References .....	72
9 Appendix.....	88