

### Hintergrund

Itaconsäure ist eine organische Säure mit großem Anwendungspotential in verschiedensten Bereichen der chemischen Industrie. Die meisten Anwendungen sind jedoch aufgrund der hohen Herstellungskosten derzeit nicht realisierbar. Momentan erfolgt die Herstellung biotechnologisch mit dem natürlichen Produzenten *Aspergillus terreus*, einem filamentösen Pilz der Itaconsäure aus dem Zitronensäurezyklusintermediat *cis*-Aconitat ableitet. Produktion von Itaconsäure in nicht natürlichen Produzenten wie *E. coli* wurde bereits erfolgreich gezeigt. Die Aktivität des Schlüsselenzyms *cis*-Aconitat Decarboxylase (CadA) in rekombinanten Organismen ist aber aufgrund eines relativ hohen  $K_M$ -Werts für *cis*-Aconitat sowie eines pH Optimums von 6,2 relativ niedrig, was die Produktion hinsichtlich Produktausbeute und Produktivität erschwert.

### Ziel der Arbeit

Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Masterarbeit das Enzym CadA hinsichtlich Aktivität in *E. coli* verbessert werden. Dazu soll ein bereits etablierter Enzymassay verwendet werden um Proteinbibliotheken die mit Zufallsmutagenese erzeugt wurden auf Varianten mit verbesserter Umsetzung zu screenen. Verbesserte Varianten auf Enzymebene sollen in weiterer Folge zunächst in Schüttelkolbenkulturen *in vivo* getestet werden auf verbesserte Umsetzung von Glukose bzw. Zitronensäure zu Itaconsäure. Vielversprechende Stämme sollen anschließend in Bioreaktorkultivierungen weiter charakterisiert werden.

### Methoden

- Zufallsmutagenese via error prone PCR zur Erstellung von Proteinbibliotheken
- Screening von Proteinbibliotheken mittels UV-Assay in 96 well Platten
- Nutzung von Koloniepicker und Liquid handling System für Enzym Engineering
- Schüttelkolbenkultivierungen mit *E. coli*
- Kultivierungen mit *E. coli* in Batch- und Fed-batch im Parallelbioreaktorsystem
- HPLC Analyse und Bilanzierung von Bioreaktorkultivierungen

### Allgemeines

Die Masterarbeit ist eine Kooperation zwischen TU München und TU Wien. Der Enzym Engineering Teil der Arbeit (~ 5 Monate) soll dabei am TUM Campus in Straubing erfolgen, die *in vivo* Charakterisierung (~ 1 Monat) an der TU Wien.

Please contact:

Dr. nat. techn. Stefan Pflügl

TU Wien  
Institute of Chemical, Environmental and  
Biological Engineering (ICEBE)  
Research Area Biochemical Engineering

Gumpendorfer Straße 1a/166-4  
A-1060 Vienna, Austria

stefan.pfluegl@tuwien.ac.at  
T: +43 1 58801 166 484

17.06.2019