

**Identifizierung und Charakterisierung  
neuartiger Oxidoreduktasen in *Gluconobacter oxydans*  
und  
Produktion des potentiellen Süßstoffes 5-Keto-D-Fruktose**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Anna Siemen**

aus  
Köln

Bonn 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

2. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl

Tag der Disputation: 07.02.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

**Büchs, J.; Deppenmeier, U.; Bott, M.; Kiefler, I.; Kosciow, K.; Herweg, E.; Siemen, A.**  
**(2017):** Methods of producing 5-ketofructose. Europäisches Patentregister (EP17175730.5).

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1) Einleitung .....	1
1.1 Industrielle Anwendungen von Essigsäurebakterien .....	1
1.2 <i>Gluconobacter oxydans</i> .....	2
1.3 Membrangebundene Dehydrogenasen .....	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	5
2) Material und Methoden .....	7
2.1 Chemikalien und Enzyme .....	7
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	7
2.2.1 Isolierung von DNA und RNA .....	7
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA .....	7
2.2.2 Spektrometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung .....	8
2.2.3 Plasmide und Oligonukleotide .....	8
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifizierung .....	12
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	14
2.2.6 Färbung der Agarosegele .....	15
2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	15
2.2.8. Enzymatische Modifikationen von DNA .....	15
2.2.9 Sequenzierung von DNA .....	16
2.3 Mikrobiologische Methoden .....	17
2.3.1 Organismen .....	17
2.3.2 Medien und Zellanzucht .....	17
2.3.3 Erstellen von Stammkulturen .....	18
2.3.4 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern .....	19
2.4 Biochemische Methoden .....	19
2.4. 1 Transformation von <i>E. coli</i> .....	19
2.4.2 Elektroporation von <i>G. oxydans</i> .....	20
2.4.3 Proteinproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE) und <i>G. oxydans</i> -Stämmen .....	21
2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	23
2.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
2.4.6 Silberfärbung .....	25
2.4.6 Spezifische Detektion von Proteinen mittels Western Blot .....	26
2.4.7 Herstellung und Substratumsatz ruhender Zellen .....	27
2.4.8 Enzymaktivitätstests .....	28
2.4.9. Wachstumsexperimente .....	31
2.4.10 Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen in Kulturen .....	32

2.4.11	Verwendete Programme und bioinformatische Methoden.....	33
3)	Ergebnisse .....	35
3.1	Identifizierung neuartiger membranständiger und periplasmatischer Oxidoreduktasen.....	35
3.2	Produktion und Charakterisierung von neuartigen löslichen Dehydrogenasen ...	39
3.2.1	Erstellung von Expressionsplasmiden.....	39
3.2.2	Produktion von löslichen Oxidoreduktasen .....	40
3.2.3	Expressionsstudien und Sequenzanalysen.....	44
3.2.4	Expression cytoplasmatischer und periplasmatischer Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> BP.9 .....	47
3.2.5	Substratumsetzung an ganzen Zellen .....	49
3.2.6	Produktion des Modellproteins YliI aus <i>E. coli</i> .....	51
3.2.7	Protein-Lokalisierung.....	52
3.2.8	Austausch des Signalpeptids .....	54
3.3	Produktion und Charakterisierung membrangebundener Oxidoreduktasen .....	56
3.3.1	Erstellung von Plasmiden für die Expression membranständiger Dehydrogenasen .....	56
3.3.2	Produktion membrangebundener Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR</i> .....	58
3.3.3	Produktion von membranständigen Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> BP.9... ..	59
3.3.4	Substratumsetzung von ganzen Zellen .....	62
3.3.5	Substratumsetzung an den Membranen der <i>G. oxydans</i> BP.9-Mutante .....	64
3.3.6	Substratumsetzung an den Membranen der <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh</i> -Mutante.....	69
3.4	Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex.....	71
3.4.1	Klonierung der Gene <i>fdhS</i> , <i>fdhC</i> und <i>fdhL</i> aus <i>G. japonicus</i> NBRC3260 ....	72
3.4.2	Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes in <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR</i> .....	73
3.4.3	Vergleich von Membranaktivitäten von <i>G. japonicus</i> NBRC3260 und <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR fdh</i> .....	75
3.5	Die Produktion des potentiellen Süßungsmittels 5-Keto-D-Fruktose.....	76
3.5.1	Umsetzung von D-Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose in wachsenden Zellen ..	77
3.5.2	<sup>13</sup> C NMR-Spektroskopie zur Identifizierung der 5-Keto-D-Fruktose.....	79
3.5.3	Keto-D-Fruktose-Reduktase – ein System zur Detektion von 5-Keto-D-Fruktose .....	81
3.5.4	Die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus dem Disaccharid Saccharose ..	85
3.5.5	Die Umsetzung von Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose in einem Stamm ....	88
3.5.6	Membranaktivität von <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR fdh</i> und <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR</i> $\Delta$ <i>1687 fdh</i> .....	97
3.5.7	Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrüben.....	98
4)	Diskussion.....	102

4.1 Identifizierung potentieller Oxidoreduktasen zur Produktion in <i>G. oxydans</i> -Stämmen.....	103
4.2 Produktion löslicher Oxidoreduktasen in <i>G. oxydans</i> -Stämmen.....	104
4.2.1 Produktion löslicher Oxidoreduktasen in <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR</i> .....	104
4.2.2 Produktion löslicher Oxidoreduktasen in <i>G. oxydans</i> BP.9 .....	113
4.2.3 Untersuchungen zur Proteintranslokation .....	114
4.3 Produktion membranständiger Dehydrogenasen in <i>G. oxydans</i> -Stämmen .....	123
4.3.1 Produktion der membranständigen Dehydrogenasen Gdi3764 und Gox1857 .....	123
4.3.2 Charakterisierung der membranständigen Dehydrogenasen Ap9076 und Ap9346 .....	129
4.4 Produktion des potentiellen Süßstoffes 5-Keto-D-Fruktose .....	135
4.4.1 Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus <i>G. japonicus</i> .....	138
4.4.2 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose mit dem Stamm <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR</i> .....	142
4.4.3 Identifizierung des Fermentationsproduktes 5-Keto-D-Fruktose mittels $^{13}\text{C}$ NMR-Spektroskopie .....	144
4.4.4 Der Ketofruktose-Reduktase-Assay – Eine neue Methode zur Quantifizierung von 5-Keto-D-Fruktose .....	146
4.4.5 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus dem Disaccharid Saccharose .....	147
4.4.6 Co-Expression der <i>fdh</i> -Gene und <i>sacC</i> in <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ <i>hsdR</i> $\Delta$ 1687 .	150
4.4.7 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrüben.....	155
5) Zusammenfassung.....	160
6) Literaturverzeichnis .....	163
7) Anhang .....	187
8) Danksagung.....	188

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Ald	Aldehyd
Alk	Alkohol
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Cef	Cefoxitin
CoA	Coenzym A
Cyt	Cytochrom
d	Tag
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DH	Dehydrogenase
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii/et aliae (und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
g	Gramm
h	Stunde
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
kcal	Kilo-Kalorien
kDa	Kilo-Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
KPB	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter



LB	Lysogeny Broth
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
M	molar [mol/L]
Mb	Mega-Basenpaare
mDH	membrangebundene Dehydrogenase
mGDH	membrangebundene Glukose-Dehydrogenase
min	Minute
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD <sub>600 nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMS	Phenazinmethosulfat
PQQ	Pyrolochinolinchinon
Pva	Polyvinyl-Alkohol
QH <sub>2</sub>	Ubichinol
RI	Brechungsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real-Time quantitative reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organisation
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
YF	Hefe-Fruktose
YG	Hefe-Glukose
YM	Hefe-Mannitol

# 1) Einleitung

## 1.1 Industrielle Anwendungen von Essigsäurebakterien

Essigsäurebakterien sind Gram-negative, stäbchenförmige Mikroorganismen innerhalb der Familie der *Acetobacteraceae*, die Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzen und daher obligat aerob leben. Die Familie der *Acetobacteraceae* umfasst insgesamt 41 Gattungen von denen die Gattungen *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* und *Gluconobacter* von besonderem industriellem Interesse sind (Sievers und Swings, 2005). Essigsäurebakterien sind in Habitaten zu finden, die sich durch hohe Zucker- und hohe Säurekonzentrationen auszeichnen, wie Blüten, Nektar, Essig und verschiedene Lebensmittel (Gupta *et al.*, 2001; Blackwood *et al.*, 1969; Gullo *et al.*, 2006; Battey und Schaffner, 2001). Da diese Mikroorganismen an niedrige pH-Werte sowie hohe Zuckerkonzentrationen adaptiert sind, basieren viele industrielle Fermentationsprozesse auf der Verwendung von Essigsäurebakterien, wie beispielsweise die Produktion von Glukonsäuren aus Glukose (Seiskari *et al.*, 1985; Gupta *et al.*, 2001). Eine metabolische Besonderheit der Gattung *Gluconobacter* ist die unvollständige Oxidation von Zuckern, Alkoholen und Polyolen zu Ketonen, Aldehyden und organischen Säuren, welche anschließend über die Porine der äußeren Membran ins Medium diffundieren. Diese unvollständige periplasmatische Oxidation erfolgt dabei durch membranständige Dehydrogenasen. Die freigesetzten Elektronen werden über den Ubichinonpool der Membran in die Atmungskette eingespeist und zur Energiekonservierung genutzt. Als terminaler Elektronenakzeptor dient hierbei Sauerstoff (de Ley *et al.*, 1984). Diese spezielle Eigenschaft der unvollständigen Oxidation wird, vor allem in der Lebensmittelindustrie, vielseitig für verschiedene Fermentationsprozesse genutzt, da Oxidationsprodukte nicht weiter verstoffwechselt und ins Medium abgegeben werden, was die Aufreinigung des Produktes erleichtert. So wird beispielsweise in der Essigsäureherstellung die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure durch *Acetobacter*-Spezies durchgeführt (Ghommidh *et al.*, 1982; Tesfaye *et al.*, 2002). Außerdem sind Essigsäurebakterien an der Produktion von Palmwein, Kakaopulver, Erfrischungsgetränken, wie Kombucha und Bionade, sowie von Aminosäuren, die für Nahrungsergänzungsmittel oder als Geschmacksverstärker verwendet werden, beteiligt (Swings und de Ley, 1977; Camu *et al.*, 2007; Kersters und de Ley, 1968; Kersters *et al.*, 2006). Die weltweite Produktion von Glukonat, ein Intermediat der Glukose-Oxidation von *Gluconobacter* Spezies, lag 2013 bei ca. 100.000 Tonnen pro Jahr mit steigender Tendenz (Sauer *et al.*, 2013). Für die Produktion von

Glukonat werden vornehmlich *Aspergillus niger* sowie *Gluconobacter*-Stämme verwendet und das Produkt fungiert unter anderem als Stabilisator und Säureregulator in Lebensmitteln (Adachi *et al.*, 2003). Auch in pharmazeutischen und medizinischen Bereichen sind Essigsäurebakterien von Bedeutung. *Gluconacetobacter xylinus* synthetisiert Cellulose, die aufgrund ihres hohen Reinheitsgrades in der Wundversorgung und in Wundheilungsprozessen genutzt wird (Czaja *et al.*, 2006). Des Weiteren ist *Gluconobacter (G.) oxydans*, der in dieser Arbeit als Expressions- und Produktionsstamm verwendet wurde, an der Synthese von Vitamin C beteiligt und wird außerdem zur Herstellung von 6-Amino-L-Sorbose genutzt, die eine Vorstufe des Diabetesmedikaments Miglitol ist. Miglitol wird bei nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus verabreicht und fungiert als  $\alpha$ -Glukosidase-Hemmer (Xu *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2014; Schedel, 2001). Da das Genom von *G. oxydans* vollständig sequenziert, sowie Expressionsvektoren für den Organismus etabliert sind, eignet sich dieses Bakterium als Modellorganismus zur Entwicklung neuer biotechnologischer Anwendungen (Prust *et al.*, 2005; Kallnik *et al.*, 2011).

## **1.2 *Gluconobacter oxydans***

Das strikt aerobe  $\alpha$ -Proteobakterium *G. oxydans* zeichnet sich durch einen besonderen Metabolismus aus, in welchem Zucker, Polyole und Alkohole unvollständig oxidiert werden (de Ley *et al.*, 1984; Kersters *et al.*, 2006). Da *G. oxydans* für die Succinyl-CoA-Synthetase und die Succinat-Dehydrogenase kodierende Gene fehlen, kann der Citrat-Zyklus nicht vollständig ablaufen. Auch der Emden-Meyerhof-Weg ist in *G. oxydans* nicht funktionell, da der Organismus kein, für die 6-Phosphofruktokinase, kodierendes Gen besitzt (Prust *et al.*, 2005; Williams und Rainbow, 1964). Somit nutzt *G. oxydans* alternative Stoffwechselwege zur Energiekonservierung und Biomassegenerierung. Generell können zwei Substratabbauewege innerhalb des oxidativen Stoffwechsels von *G. oxydans* unterschieden werden. Zum einen werden Substrate periplasmatisch durch Dehydrogenasen oxidiert, die in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert und deren aktives Zentrum ins Periplasma orientiert sind. Zum anderen können Zucker sowie Glukonat durch Kinasen cytoplasmatisch phosphoryliert und anschließend in den Pentosephosphatweg oder den Entner-Doudoroff-Weg eingespeist werden (Parmentier *et al.*, 2005; Matsushita *et al.*, 1994b, 1994a). Durch die Oxidation der membrangebundenen Dehydrogenasen (mDHs) entstandene Zwischenprodukte, wie Ketoglukonsäuren, können ebenfalls ins Cytoplasma aufgenommen, und in einem anschließenden Prozess von cytoplasmatischen NAD(P)-abhängigen Oxidoreduktasen zu Glukonat reduziert und somit in den intrazellulären Stoffwechsel reintegriert werden. Da die

Oxidationsraten der mDHs sehr hoch sind, läuft 90 % der Substrat-Oxidation periplasmatisch ab, sodass die Elektronen, die zur Generierung des elektrochemischen Potentials und somit zur Energiekonservierung genutzt werden, hauptsächlich aus Oxidationsprozessen der mDHs stammen. Lediglich 10 % der Kohlenstoffverbindungen werden cytoplasmatisch metabolisiert und über den Pentosephosphatweg und den Entner-Doudoroff-Weg in die Biosynthese eingespeist, was zu einer sehr niedrigen Biomasseproduktion bei *G. oxydans* führt (Deppenmeier *et al.*, 2002; Olijve und Kok, 1979b). Die durch die Substratumsetzung der mDHs freigesetzten Elektronen werden auf die Q10-Typ Ubichinone der cytoplasmatischen Membran übertragen und von endständigen Chinol-Oxidasen zur Reduktion von  $\frac{1}{2}$  O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O genutzt. Zusätzlich zu einer Chinol-Oxidase des bo<sub>3</sub>-Typs besitzt *G. oxydans* eine weitere Cyanid-unempfindliche Chinol-Oxidase vom bd-Typ (Richhardt *et al.*, 2013b; Miura *et al.*, 2013). Studien zeigten, dass zwar keine der beiden Oxidasen essentiell ist, die bo<sub>3</sub>-Oxidase jedoch eine weitaus größere Rolle im oxidativen Metabolismus besitzt. Die membranintegrierte, Protonen translozierende Chinol-Oxidase vom bo<sub>3</sub>-Typ oxidiert Ubichinol und überträgt die dabei freigesetzten Elektronen auf Sauerstoff als endständigen Elektronenakzeptor, wobei ein elektrochemisches Potential erstellt wird. Eine ATP-Synthase vom F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Typ, die aus einem membrangebundenen und einem löslichen Modul besteht, nutzt anschließend das elektrochemische Potential zur ATP-Generierung (Prust *et al.*, 2005; Richhardt *et al.*, 2013b; Miura *et al.*, 2013; Matsushita *et al.*, 1987). *G. oxydans* besitzt keine Protonen translozierende NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), verfügt aber über eine aus einer einzelnen Untereinheit bestehende Typ-II NADH-Dehydrogenase, die jedoch keine Protonen transloziert (Prust *et al.*, 2005). Die Regenerierung von NAD<sup>+</sup> läuft über die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Typ II), die NADH oxidiert und Chinon zu Chinol reduziert. Des Weiteren verfügt *G. oxydans* über Gene für ein Protein, das homolog zu einer Protonen-translozierenden Transhydrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* ist. Eine solche Transhydrogenase könnte der Oxidation von NADPH und damit der Regulierung des Gleichgewichts zwischen NADH und NADPH sowie der Aufrechterhaltung des Protonengradienten dienen (Deppenmeier und Ehrenreich, 2009). NADH und NADPH dienen vielen cytoplasmatischen, Oxidoreduktasen als Redoxpartner. Je nach physiologischen Bedingungen und metabolischer Aktivität werden unterschiedliche Konzentrationen der Redox-Cofaktoren benötigt, sodass eine schnelle Umwandlung ineinander und somit eine schnelle Bereitstellung des benötigten NAD(P)/NAD(P)H wichtig für die Zelle ist.

### 1.3 Membrangebundene Dehydrogenasen

Ein verbreitetes Problem, das bei chemischen Synthesen von Feinchemikalien und industrieller Ausgangsstoffe auftritt, ist die unerwünschte Entstehung von Stereoisomeren, deren Trennung vom gewünschten Produkt kostspielig und aufwendig ist (Drauz und Waldman, 2002). Der Einsatz von stereospezifischen Enzymen in der Synthese von industriell interessanten Substanzen, wie reinen Alkoholen, Aldehyden und Ketonen, oder von Synthesebausteinen wichtiger pharmazeutischer Produkte, wie Medikamenten oder Nahrungsergänzungsmitteln, ist bereits industriell etabliert (Moore *et al.*, 2007; Fuganti und Grasselli, 1982; Rabenhorst *et al.*, 2001; Dubal *et al.*, 2008). Membrangebundene Dehydrogenasen werden beispielsweise in der Produktion von Glukonat, Vitamin C und Aromastoffen, sowie als Biosensoren zur Detektion von Zuckern in Lebensmitteln, oder im Blut eingesetzt (Adachi *et al.*, 2003; Bremus *et al.*, 2006; Wang, 2008). Da die membranständigen Dehydrogenasen von *G. oxydans* Polyole, Zucker und Alkohole regio- und stereospezifisch nach der Bertrand-Hudson-Regel oxidieren, sind sie von großem Interesse für die Industrie in Hinblick auf die Produktion enantiomerreiner Substanzen (Kulhánek, 1990). Die Bertrand-Hudson-Regel besagt, dass Polyole, die Hydroxylgruppen in *cis*-Arrangement und D-Konfiguration zu einer angrenzenden primären Alkoholgruppe aufweisen, regioselektiv zu den korrespondierenden Ketonen oxidiert werden (Schedel, 2001). Basierend auf ihrem Cofaktor bzw. ihrer prosthetischen Gruppe, lassen sich die membranständigen Dehydrogenasen aus *G. oxydans* in zwei Hauptgruppen unterteilen (Davidson, 2004; Matsushita *et al.*, 1994a, 1994a): Gruppe I der membranständigen Dehydrogenasen umfasst Enzyme, die Pyrrolo-Chinoline-Chinon (PQQ) als prosthetische Gruppe aufweisen und Gruppe II beinhaltet Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Dehydrogenasen. Einige der membranständigen Dehydrogenasen besitzen, neben FAD oder PQQ, ein zusätzliches Häm *c* als prosthetische Gruppe. Die drei wichtigsten membranständigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* sind die bereits erwähnte Glukose-Dehydrogenase (Gox0265), eine Alkohol-Dehydrogenase (Gox1067-1068, Gox0756) und eine Polyol-Dehydrogenase (SldAB). Die Glukose-Dehydrogenase Gox0265, die PQQ als Cofaktor besitzt, kann Glukose und weitere Zucker, wie 2-Deoxy-D-Glukose und Fucose, zu ihren korrespondierenden Ketozuckersäuren umsetzen (Meyer *et al.*, 2013). Die Alkohol-Dehydrogenase besteht aus drei Untereinheiten, wovon eine ein Cytochrom *c* ist, und oxidiert vornehmlich Ethanol, aber auch primäre Alkohole, Glycerol und Aldehyde (Adachi *et al.*, 1978; Mientus *et al.*, 2017; Habe *et al.*, 2010). Die Dehydrogenase mit dem größten Substratspektrum ist die PQQ-abhängige Polyol-Dehydrogenase SldAB, die Mannitol, Sorbitol, Glukonat und Glycerol, sowie sekundäre

Alkohole, Aldosen und Diole umsetzt (Peters *et al.*, 2013; Mientus *et al.*, 2017). Des Weiteren besitzt *G. oxydans* eine Inositol-Dehydrogenase (Gox1857), die myo-Inositol oxidiert, eine Glukonat-Dehydrogenase (Gox1230–1232), die lediglich Glukonat zu 2-Ketoglukonat oxidiert, eine Aldehyd-Dehydrogenase (Gox0585–0587), die Acetaldehyd zu Acetat umsetzt, sowie primäre Aldehyde oxidiert und eine putative Laktat-Dehydrogenase (Gox1253) (Hölscher *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2013; Prust *et al.*, 2005). Neben den bereits charakterisierten FAD- und PQQ- abhängigen Dehydrogenasen besitzt *G. oxydans* eine Vielzahl an Oxidoreduktasen mit unbekannter Funktion. Aufgrund ihrer Stereospezifität und dem damit verbundenen industriellen Potential, das diese Enzyme aufweisen, ist die Identifizierung und Charakterisierung neuer, noch nicht charakterisierter Oxidoreduktasen von großem industriellen Interesse, vor allem in Hinblick auf die Entwicklung neuer bzw. Weiterentwicklung bestehender industrieller Applikationen.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Aufgrund der Fähigkeit zur regio- und stereoselektiven Oxidation von Substraten, weisen PQQ- und FAD-abhängige Oxidoreduktasen im Hinblick auf die Entwicklung neuer industrieller Synthese- und Fermentationsprozesse ein hohes Potential auf (Schweiger *et al.*, 2007; Deppenmeier und Ehrenreich, 2009; Gupta *et al.*, 2001). Eine Reihe von PQQ- und FAD-abhängigen Enzymen werden bereits zur Herstellung von enantiomerreinen Alkoholen, Aldehyden, Hydroxy-Ketonen, oder organischen Säuren eingesetzt, die als Ausgangsstoffe in Syntheseverfahren im Bereich der Nahrungsmittel-, pharmazeutischen und medizinischen Industrie verwendet werden (Dubal *et al.*, 2008; Schrader *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 2012). So wurde beispielsweise eine PQQ-abhängige Alkohol-Dehydrogenase aus *Acetobacter pasteurianus* isoliert, die zur Produktion von enantiomerreinem Glycidol genutzt werden kann, das die Vorstufe vieler pharmazeutischer Produkte, wie  $\beta$ -Blocker und antiviraler Wirkstoffe darstellt (Machado *et al.*, 1999). Auch aus *G. oxydans* sind bereits lösliche Oxidoreduktasen charakterisiert, die stereospezifisch  $\alpha$ -Diketone zu den korrespondierenden (S)-Hydroxyketonen reduzieren, welche beispielsweise in der Produktion von Vitamin E Anwendung finden (Schweiger *et al.*, 2013; Fuganti und Grasselli, 1982). Die Identifizierung und Charakterisierung noch unbekannter PQQ- oder FAD-abhängiger Oxidoreduktasen ist somit von großem industriellem Interesse und war daher das Ziel der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe von BlastP-Analysen sollten zunächst potentiell interessante Oxidoreduktasen identifiziert werden, die sequenzielle Ähnlichkeiten zu bereits industriell etablierten Enzymen, wie beispielsweise Glukose- oder Sorboson-Dehydrogenasen, aufweisen, welche

eine wichtige Rolle in der Produktion von Glukonat und Vitamin C spielen (Pappenberger und Hohmann, 2014; Schmid und Urlacher, 2007). Des Weiteren sollten Oxidoreduktasen identifiziert werden, die Homologien zu unbekanntem Dehydrogenasen aus *G. oxydans* aufweisen, um über deren Charakterisierung einen Hinweis auf die Rolle der Enzyme in *G. oxydans* selbst zu erlangen. Über eine anschließende Produktion und Charakterisierung der Enzyme in *G. oxydans*, würde deren Potential für den Einsatz in industriellen Syntheseprozessen analysiert werden. Durch den Einsatz verschiedener *G. oxydans*-Expressionsstämme sollte außerdem die Proteinproduktion optimiert werden. Basierend auf der Produktion PQQ- oder FAD-abhängiger Oxidoreduktasen könnte zudem eine biotechnologische Anwendung entwickelt werden, die die Herstellung von Süßstoffen ermöglicht. Die Zunahme von Krankheitsbildern wie Fettleibigkeit und Diabetes wurde im letzten Jahrzehnt weltweit beobachtet und basiert primär auf der erhöhten Aufnahme von Kohlenhydraten, die vor allem in Form von künstlich zugefügten Zuckern in Lebensmitteln auftreten. Aus diesem Grund gewinnen Zuckerersatzstoffe in der heutigen Gesellschaft immer mehr an Bedeutung (Blum *et al.*, 2014; Vartanian *et al.*, 2007; Montonen *et al.*, 2007). Da die Nachfrage an zuckerarmen Produkten nicht nur für Diabetespatienten, sondern auch für den Normalverbraucher stetig steigt, hat der Einsatz von Süßstoffen in Nahrungsprodukten stark zugenommen. Die Einnahme von artifiziellen Süßungsmitteln beim Menschen kann unter Umständen zu Blähungen oder anderen Unverträglichkeiten führen, sodass die Identifizierung und Produktion natürlich vorkommender Süßstoffe mit niedrigen Kalorienwerten an Bedeutung für die Nahrungsmittelindustrie gewonnen hat (Weihrauch und Diehl, 2004; Soffritti *et al.*, 2006; Suez *et al.*, 2014). Innerhalb dieser Arbeit sollte der Fokus auf der Entwicklung eines bakteriellen Fermentationssystems zur Produktion von kalorienarmen Zuckerderivaten liegen. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen sollte der Fruktose-Dehydrogenase-Enzymkomplex aus *G. japonicus* stehen, der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert. 5-Keto-D-Fruktose ist vom Menschen nur schlecht, bzw. nicht metabolisierbar und weist eine ähnliche Süßkraft wie Fruktose auf (Wyrobnik *et al.*, 2012; persönliche Mitteilung, M. Sc. Elena Herweg, RWTH Aachen). Diese Eigenschaften machen 5-Keto-D-Fruktose zu einem neuen, alternativen Süßungsmittel mit großem Potential. Nach erfolgter Entwicklung eines Synthese-Verfahrens zur Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose, sollte zudem die Anpassung des Systems an industrielle Maßstäbe erfolgen, sodass eine Produktion von 5-Keto-D-Fruktose industriell möglich wird.

## **2) Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien und Enzyme**

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen worden.

Enzyme wie die *Taq*- und Phusion-DNA-Polymerase, die T4-DNA-Ligase, die alkalische Phosphatase, die DNase I, sowie verschiedene Restriktionsendonukleasen, und PCR-Reagenzien wurden von der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen.

### **2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1 Isolierung von DNA und RNA**

##### **2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Das genaue Vorgehen kann der Anleitung des Herstellers entnommen werden.

##### **2.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA**

Die Isolierung genomischer DNA wurde mit Hilfe des Kits GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) nach dem Protokoll D für Gram-negative Bakterien durchgeführt. Das genaue Vorgehen kann den Angaben des Herstellers entnommen werden.

##### **2.2.1.3 Isolierung von RNA**

Alle Materialien, die für die RNA-Isolierung verwendet wurden, erfuhren zunächst eine zweifache Autoklavierung, um die RNasen zu inaktivieren. Für die Isolierung der mRNA wurden *G. oxydans*-Kulturen in YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 kultiviert und dann geerntet (10 min, 4000 rpm). Die Zellpellets wurden in 5 ml TRI Reagent (Sigma-Aldrich, München) aufgenommen und jeweils 1 ml-Aliquots der Suspension wurden separat in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT), wurden die Ansätze mit 100 µl 1-Bromo-3-chloropropan versetzt, invertiert und erneut für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm für 10 min bei 4 °C. Die klaren, oberen Phasen der Aliquots, die die RNA enthielten, wurden vereinigt und



500 µl Isopropanol pro 1 ml TRI Reagenz hinzugegeben, um die Nukleinsäuren zu fällen. Die Proben wurden gemischt, für 5-10 min bei -20 °C inkubiert und dann für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (75 % [v/v]) gewaschen, bei RT getrocknet und in 90 µl rH<sub>2</sub>O resuspendiert. Um die RNA von DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde nach der RNA-Isolierung ein DNase-Verdau durchgeführt. 90 µl der in rH<sub>2</sub>O aufgenommenen RNA wurde mit 10 µl DNase-Puffer (10×) versetzt und für 2 h mit 2 µl DNase bei 37 °C inkubiert. Dann wurden dem Ansatz nochmals 2 µl DNase hinzugefügt und dieser für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem Kit SurePrep RNA Cleanup and Concentration (Fisher Scientific, Schwerte) nach Anleitung des Herstellers.

### **2.2.2 Spektrometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der isolierten mRNA und DNA wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurden 2 µl der Nukleinsäure zunächst mit 98 µl rH<sub>2</sub>O versetzt. In einer 100 µl-Quarzküvette wurde die Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gegen rH<sub>2</sub>O als Leerwert gemessen. Die Konzentration der mRNA und DNA konnte anschließend über folgende Formeln berechnet werden:

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g DNA/ml}]$$

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g RNA/ml}]$$

Über das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm, wo das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren liegt, kann eine eventuelle Verunreinigung der Nukleinsäuren durch Proteine erkannt werden. Weisen die Nukleinsäuren einen hohen Reinheitsgrad auf, liegt das Verhältnis  $A_{260}:A_{280}$  im Falle von DNA bei 1,8 und im Falle von RNA bei 2.

### **2.2.3 Plasmide und Oligonukleotide**

#### **2.2.3.1 Plasmide**

Die Plasmide, die in dieser Arbeit für Expressionsversuche und Klonierungen verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pASK-IBA5	Tetracyclin induzierbarer Promoter/ Operator, N-terminal Streptag II, Ampicillin-Resistenz	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)
pASK5_St_Kf-ReduktaseTM	pASK-IBA5-Derivat zur Expression der Ketofruktose-Reduktase aus <i>T. morbirosei</i>	diese Arbeit
pBBR1MCS-2	<i>mob, rep, Kan<sup>R</sup>, lacZ</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR1p264	pBBR1MCS-2 Derivat mit der Promotorregion des Gens <i>gox0265</i>	Kallnik <i>et al.</i> (2010)
pBBR1p452	pBBR1MCS-2 Derivat mit der Promotorregion des Gens <i>gox0452</i>	Kallnik <i>et al.</i> (2010)
pBBR1p264-St	pBBR1p264 mit Streptag II aus pASK-IBA3plus	Meyer (2014)
pBBR1p452-St	pBBR1p452 mit Streptag II aus pASK-IBA3plus	Meyer (2014)
pBBR1p264-Streplong	pBBR1p264 Derivat mit modifiziertem Streptag (verlängerte Linkersequenz)	Zeiser <i>et al.</i> (2014)
pBBR1p452-Streplong	pBBR1p452 Derivat mit modifiziertem Streptag (verlängerte Linkersequenz)	Meyer, (2014)
pBBR1p264_ <i>pelB</i> _SL	pBBR1p264_Streplong Derivat mit dem Signalpeptid <i>pelB</i> aus pET22(+)	Zeiser <i>et al.</i> (2014)
pBBR1p264- <i>fdh</i> -St	pBBR1p264-St Derivat, zur Expression von <i>fdhS</i> , <i>fdhC</i> und <i>fdhL</i>	diese Arbeit
pBBR1p264- <i>swit1323</i> -Sl	pBBR1p264_Streplong Derivat zur Expression von <i>swit1323</i>	Zeiser (2015)
pBBR1p264- <i>swit1054</i> -Sl	pBBR1p264_Streplong Derivat zur Expression von <i>swit1054</i>	Zeiser (2015)
pBBR1p264- <i>swit0721</i> -Sl	pBBR1p264_Streplong Derivat zur Expression von <i>swit0721</i>	Zeiser (2015)
pBBR1p264- <i>gox1630</i> -St	pBBR1p264_St Derivat zur Expression von <i>gox1630</i>	Schweiger (2008)
pBBR1p264- <i>YilI</i> -Sl	pBBR1p264_Streplong Derivat zur Expression von <i>YilI</i>	diese Arbeit
pBBR1p264- <i>acry1741</i> -Sl	pBBR1p264_Streplong Derivat zur Expression von <i>acry1741</i>	diese Arbeit
pBBR1p264- <i>acry2797</i> -Sl	pBBR1p264_Streplong Derivat zur Expression von <i>acry2797</i>	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pBBR1p264-pelB- <i>acry1741</i> -SI	pBBR1p264- <i>acry1741</i> -SI Derivat mit <i>pelB</i> Signalpeptidsequenz zur Expression von <i>acry1741</i>	diese Arbeit
pBBR1p264-SP2219- <i>acry1741</i> -SI	pBBR1p264- <i>acry1741</i> -SI Derivat mit SP2219 Signalpeptidsequenz zur Expression von <i>acry1741</i>	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gox1857</i> -St	pBBR1p452-ST Derivat, zur Expression von <i>gox1857</i>	Meyer (2014)
pBBR1p452- <i>gdi3764</i> -St	pBBR1p452-ST Derivat, zur Expression von <i>gdi_3764</i>	Meyer (2014)
pBBR1p264- <i>ap9076</i> -SI	pBBR1p264_ <i>Streplong</i> Derivat zur Expression von <i>ap9076</i>	diese Arbeit
pBBR1p264- <i>ap9346</i> -SI	pBBR1p264_ <i>Streplong</i> Derivat zur Expression von <i>ap9346</i>	diese Arbeit
pBBR1p264pelB- <i>SacC</i> -SI	pBBR1p264_ <i>pelB</i> _SI Derivat zur Expression von <i>sacC</i>	Kosciow (2017)
pBBR1p264- <i>sacC</i> - <i>fdh</i> -Strep	pBBR1p264-St Derivat, zur Co-Expression von <i>sacC</i> , <i>fdhS</i> , <i>fdhC</i> und <i>fdhL</i> unter Kontrolle des <i>p264</i> -Promotors	diese Arbeit
pBBR1p264 <i>sacCp264fdh</i>	pBBR1p264-St Derivat mit zweiter <i>p264</i> -Promotorresion, zur Co-Expression von <i>sacC</i> , <i>fdhS</i> , <i>fdhC</i> und <i>fdhL</i>	diese Arbeit
pBBR1p264 <i>sacCp265fdh</i> -St	pBBR1p264-St Derivat zur Co-Expression von <i>sacC</i> , <i>fdhS</i> , <i>fdhC</i> und <i>fdhL</i>	diese Arbeit

### 2.2.3.2 Oligonukleotide

Die Sequenzen der, für die Klonierungen sowie für Kolonie- und RT-qPCR, verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet. Die Primer wurden manuell entworfen und durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

**Tabelle 2:** Verwendete Primer. Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen die Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme

Oligonukleotid	Sequenz	Restriktions-Schnittstelle
pBBR1-for	ACTCACTATAGGGCGAATTG	
pASK_rev	CGCAGTAGCGGTAAACG	
p264_ <i>sacC</i> _fw	ATAAC <u>GATCGTTG</u> CGCTGAATGAGA	<i>PvuI</i>
p264_ <i>sacC</i> _rev	ATAAGAGCTCTTAGCGACGACGATCCG	<i>SacI</i>

Oligonukleotid	Sequenz	Restriktions-Schnittstelle
FDH_p265_rev	TCCTGAGCTCATGGAAAAAATAGC	<i>PvuI</i>
FDH_p265_fw	TATTCGATCGTTACCCCTGTTTC	<i>SacI</i>
frucdh_ClaI-f	GTACATCGATTTCAGGAGAAGGCCAATGGAAAAAAT	<i>ClaI</i>
frucdh_SnaBI-r	TCAGTACGTACCCCTGTTTCAGGTCATTGAGAA	<i>SnaBI</i>
acry_2797.3_fw	GACGGTACGTAATGAGAACCGACCGACCAA	<i>SnaBI</i>
acry_2797_rev	TATTGGCGCGCCTAACTTCGAGAGC	<i>AscI</i>
RTq_sw1054_fw	TGTCTGGTCGGTGATATCGG	
RTq_sw1054_rev	TAGTCCCAGATGTCGTGGTG	
RTgap_f	TCCGACTTCAACCATGACAA	
RTgap_r	GTTGTCGTACCACGAGCAGA	
1741_oSP_fw	TATTTACGTACCCGCCTACCCGAGC	<i>SnaBI</i>
acryCF51741_fw	GACGGTACGTAATGAAGTCCAGATTT	<i>SnaBI</i>
acry1741_rev2	TACAAGGCGCGCCGCCATTGAGCGCGAA	<i>AscI</i>
YliI_for	AAGATACGTAGCTCCTGCAACGGTAAA	<i>SnaBI</i>
YliI_rev	AACAGGCGCGCCGCGTGGGCTAACTTT	<i>AscI</i>
sacC_fw	TATTGAATTCATACCGTCGACCGTCGA	<i>EcoRI</i>
sacC_rev	AATAATCGATTTTATTTGCGACGATCCG	<i>ClaI</i>
swit_1961_fw1	TCGAGGTACGTAATGGTGAACGACGAG	<i>SnaBI</i>
swit_1961_rev1	GCCGAAGGCGCGCCTTCGGCAG	<i>AscI</i>
swit_2227_fw	GCCAGCTACGTAGGCGGCACG	<i>SnaBI</i>
swit_2227_rev	AAAGGATACGTAGTGCATCCGGTT	<i>SnaBI</i>
swit_4160_fw1	GGCTGCTACGTAGTCGGCGGGTCA	<i>SnaBI</i>
swit_4160_rev1	GGCGGACGGCGCGCCGCGCGA	<i>AscI</i>
swit_1001_fw1	CGCACGTCTACGTACAGGAAGGCGGC	<i>SnaBI</i>
swit_1001_rev1	GAGAGGAGGCGCGCCATTCCCCGCC	<i>AscI</i>
swit_1323_fw1	GCGGTGTACGTACAGCCGGTGAGC	<i>SnaBI</i>
swit_1323_rev1	GGCCGCCAGTACGTACTGCGCGCC	<i>SnaBI</i>
apgdh_9346_fw2	CCGTGTACGTAATGGCTGACACTCAG	<i>SnaBI</i>
ap_gdh9346_rev	TTCTGGCGCGCCTTTCTGGCTCAGTGCC	<i>AscI</i>
apgdh_9076_fw2	CGGGTGTTTAAAATGATACAAACGAATAGT	<i>DraI</i>

Oligonukleotid	Sequenz	Restriktions-Schnittstelle
ap_gdh9076_rev	ATTTGGCGCGCCGTGTTTTGCCTG	AscI

### 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifizierung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) ist eine *in vitro* Methode zur Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte. Der Ablauf der PCR lässt sich in 3 Phasen unterteilen: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation.

Im ersten Schritt der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur in zwei Einzelstränge getrennt. Anschließend lagern die synthetisch erzeugten Primer im Hybridisierungsschritt bei einer primerspezifischen Temperatur ( $T_A$ ) an die Einzelstränge an. Im dritten Schritt, der Elongation, erfolgt dann die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte, die durch eine DNA-Polymerase katalysiert wird. Dauer der Vervielfältigung und Qualität des Endprodukts variieren je nach Wahl der Polymerase und Länge des PCR-Produktes.

Vor Beginn des 3-Phasen-Zyklus wird eine Initialdenaturierung durchgeführt, um eine vollständige Trennung der Doppelstränge sicher zu stellen. Nach Abschluss des Reaktionszyklus erfolgt eine terminale Elongation bei 72°C.


#### 2.2.4.1 PCR zur Amplifizierung von Genen

Für das Amplifizieren von DNA-Fragmenten, die anschließend für Klonierungen verwendet wurden, wurde die Phusion-Polymerase eingesetzt (Fermentas/St- Leon-Rot). Die Phusion-Polymerase weist eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf (Korrekturlesefunktion), sodass ihre Fehlerrate sehr gering ist. Diese Polymerase verknüpft 1000 Nukleotide pro Minute.

##### PCR-Ansatz:

10 x HF-Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	1 µl
DMSO (100 %)	1 µl
dNTP's (25 mM)	0,3 µl
Forward-Primer (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer (10 µM)	1 µl
DNA	1 µl
Taq-Polymerase (2,5 U/µl)	0,2 µl
rH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

##### PCR-Programm:

98 °C	1 min	 30x
98 °C	20 s	
$T_A$	15 s	
72 °C	15 – 30 s/kb	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

#### 2.2.4.2 Kolonie-PCR


Für Kolonie-PCR-Ansätze, die zum Nachweis einer erfolgten Plasmidaufnahme nach Klonierungs- und Transformationsprozessen durchgeführt wurde, wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Die *Taq*-Polymerase (Fermentas/St- Leon-Rot) arbeitet langsamer als die Phusion-Polymerase und weist eine höhere Fehlerrate auf, da sie keine Korrekturlesefunktion besitzt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Zellkolonien von einer Agarplatte abgenommen und in 10 µl sterilem rH<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die anschließende PCR wurden 5 µl der Zellsuspension eingesetzt.

##### PCR-Ansatz:

10 x Dream Taq Green Puffer	2,5 µl
DMSO (100 %)	1,25 µl
dNTP's (25 mM)	0,3 µl
Forward-Primer (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer (10 µM)	1 µl
DNA (Zellsuspension)	5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	0,25 µl
rH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

##### PCR-Programm:

95 °C	10 min
95 °C	45 s
T <sub>A</sub>	30 s
72 °C	1 min/kb
72 °C	5 min
4 °C	∞



#### 2.2.4.3 RT-qPCR

Die RT-qPCR (quantitative reverse Transkription-PCR) wurde eingesetzt, um die Expressionsstärke der Gene zu überprüfen, die auf den erstellten Expressionsplasmiden kodiert lagen, bzw. um deren generelle Expression nachzuweisen zu können. Dafür wurde, aus einer Präparation der Gesamt-RNA, die Menge der mRNA des auf dem Plasmid kodierten Gens mit der mRNA-Menge eines Referenzgens verglichen, das konstant im Organismus exprimiert wird. Für die RT-qPCR wurde das SYBR Green RT-qPCR Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet sowie der iCycler von BioRad (München, Deutschland). Als konstitutiv exprimiertes Referenzgen für *G. oxydans* 621H wurde das Gen *gox0508*, das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert, ausgewählt. Bei der RT-qPCR wird die RNA im Ansatz zunächst durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, sodass zu PCR-Beginn eine zur mRNA äquivalente Menge an DNA vorliegt, die dann als Template für folgende Replikationszyklen dienen kann. Über die Fluoreszenzzunahme des in die DNA bei der Vervielfältigung eingebauten SYBR Green Farbstoffes, kann ein quantitativer Vergleich vom Referenzgen und dem Gen von Interesse erfolgen. Um sicherzustellen, dass keine Kontaminationen der RNA mit DNA vorlagen, wurde für jeden PCR-Ansatz ein zusätzlicher Kontrollansatz ohne reverse Transkriptase angesetzt.

### RT-qPCR-Ansatz:

2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 µl
QuantiTect RT Mix	2 µl
Primermix (Forward- u. Reverse-Primer; 5 pmol/µl)	2 µl
RNA	250 µg
r H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### Rt-qPCR-Programm:

Schritt:	Zeit:	Temperatur:
Reverse Transkription	10 min	50 °C
Initiale Denaturierung	15 min	95 °C
Denaturierung	5 s	95 °C
Hybridisierung	15 s	60 °C
Elongation	15 s	72 °C
Schmelzkurve	20,5 min	35 – 95 °C

Mit Hilfe der Software iCycler wurde für jede Reaktion der Ct-Wert (cycle threshold, Schwellenwert) ermittelt, der den Zyklus der RT-qPCR beschreibt, bei dem erstmals das Fluoreszenzsignal der Probe den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Anschließend wurde der  $\Delta$ Ct-Wert berechnet, der sich aus der Differenz des Ct-Wertes des Referenzgens und dem Ct-Wert des Zielgens ergibt.

### **2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Je höher die Agarose-Konzentration des Gels ist, desto kleinporiger ist das Gel. Zur Auftrennung wird eine elektrische Spannung über das Gel gelegt, sodass die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Gel zur positiven Elektrode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich hierbei reziproproportional zu der Molekülgröße.

<u>Marker-Längenstandard:</u>	<u>50 × Tris-Acetat-EDTA-Puffer:</u>	<u>Agarosegel (1 %):</u>		
6 x Glycerin-	20 µl	2 M Tris	Agarose	1 g
Ladepuffer $\Lambda$ -DNA	20 µl	1 M Essigsäure	TAE-Puffer	100 ml
dH <sub>2</sub> O	60 µl	0,05 mM EDTA		
		ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O		
		pH 8		

Der PCR-Ansatz wurde, sofern nicht im PCR-Puffer bereits enthalten, 1:6 mit 6 x Glycerin-Ladepuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Das im 6 x Glycerin-Ladepuffer enthaltene Glycerol ist ein hydrophiles

Polysaccharid, das die DNA beschwert und das Absinken der Proben in die Taschen gewährleistet. Durch das Bromphenolblau wird die Lauffront des Gels markiert. Als Marker wurde ein 1 kb-DNA-Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für 1 Stunde.

### **2.2.6 Färbung der Agarosegele**

Um die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden die Gele für 15-20 min in einer GelRed-Färbelösung inkubiert. Durch eine Komplexbildung des GelRed-Reagens (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 3 x in Wasser, Biotium, Hayward, Kalifornien, USA) mit Nucleinsäuren können DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dokumentiert wurden die Gele mit Hilfe der Geldokumentationsanlage der Firma INTAS (INTAS GmbH Digital Imaging and Microscopy, Göttingen, Deutschland). Im Falle einer nachfolgenden Isolierung der DNA aus dem Gel wurde dieses nur kurz dem kurzwelligem Auflicht (254-265 nm) ausgesetzt, um UV-induzierte Mutationen der DNA zu vermeiden.

### **2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland), mit dem DNA-Fragmente mit einer Größe von 25 bp bis 20 kbp aus Agarosegelen isoliert werden können. Beim Aufreinigungsprozess wird zu dem ausgeschnittenen Agarosegelstück oder zum PCR-Ansatz ein Bindepuffer hinzugegeben, der denaturierende Substanzen enthält, die Agarosepolymere dissoziieren und Proteine denaturieren. Die Gellösung wird dann auf eine im Kit enthaltene Säule gegeben, die eine Siliziumdioxidmembran enthält, an welche die gelöste DNA bindet. Durch mehrere Waschvorgänge mit einem ethanolhaltigem Waschlösungspuffer wird die DNA gereinigt und dann mit rH<sub>2</sub>O von der Membran eluiert. Die genaue Durchführung ist der Anleitung des Kits zu entnehmen.

## **2.2.8. Enzymatische Modifikationen von DNA**

### **2.2.8.1 Restriktionsverdau**

Die enzymatische Modifikation von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen, die zum Verdau von Plasmiden und chromosomaler DNA sowie zur Modifikation von PCR-Produkten eingesetzt wurden. Für die Verdau wurden verschiedene Endonukleasen verwendet. Diese aus Bakterien isolierten Restriktionsenzyme haben unterschiedliche Erkennungssequenzen, an denen sie die DNA schneiden. So können entweder glatte Enden oder aber durch versetztes Schneiden kohäsive Enden, die einen Nukleotid-Überhang



aufweisen, entstehen. Je nach Art des Verdau betrug die Inkubationszeit 2 bis 4 Stunden bei 37 °C. Nach dem Verdau wurde die DNA mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction Kits von Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) aufgereinigt.

#### Ansatz eines Restriktionsverdau:

10 - 20 µl zu verdauendes Plasmid/DNA-Fragment  
10 × Restriktionspuffer (1:10 zum Gesamtvolumen)  
0,5 - 2 µl Restriktionsenzym 1  
0,5 - 2 µl Restriktionsenzym 2  
dH<sub>2</sub>O

#### **2.2.8.2 Alkalische Dephosphorylierung von DNA**

Bei Verdau eines Plasmids mit nur einem Restriktionsenzym bzw. mit Enzymen, die glatte Enden erzeugen, besteht ein erhöhtes Risiko, dass es zur Religation des Vektors kommt. Um dies zu vermeiden, wird der Vektor nach dem Verdau mit alkalischer Phosphatase behandelt. Alkalische Phosphatasen hydrolysieren Phosphatsäureester, sodass überhängende Phosphatgruppen an den Vektorschnittstellen, die die Religation ermöglichen, entfernt werden. Die Phosphatase (1 µl, 5 U) wurde nach Ablauf der Inkubationszeit in der Verdau gegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert und dann mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction Kit oder das GeneJET™ PCR Purification Kit aufgereinigt.

#### **2.2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Beim Ligationsvorgang werden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden von DNA-Doppelsträngen miteinander verbunden. Katalysiert wird diese Reaktion von der T4-Ligase, die als Cofaktor ATP benötigt. Das Gesamtvolumen eines Ligationsansatzes betrug 20 µl mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3. Die Konzentration des Ligasepuffers betrug 1/10 des Gesamtvolumens, und es wurden 2 µl Ligase (0,5 U) eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

#### **2.2.9 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung der klonierten Plasmid-DNA wurde von der Firma StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Für die Sequenzierung aller Derivate des pBBR1-p264-Vektors wurden die Primer p264-f und pASK-rev und für Derivate des pASK-IBA5-Vektors die Primer pASK-rev und pASK-for verwendet. Ein Ansatz bestand aus 1 µl DNA, 1 µl Forward-Primer (10 µM), 1 µl Reverse-Primer (10 µM) und 4 µl rH<sub>2</sub>O

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Organismen

In Tabelle 3 sind die Stämme aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3:** Verwendete Organismen

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H (DSM 2343)	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	De Ley <i>et al.</i> (1984)
<i>Gluconobacter oxydans</i> $\Delta$ hsdR	$\Delta$ hsdR Derivat von <i>G. oxydans</i> 621H (Deletion von <i>gox2567</i> )	Bringer-Meyer, Forschungszentrum Jülich
<i>Gluconobacter oxydans</i> BP.9	Derivat von <i>G. oxydans</i> 621H $\Delta$ upp $\Delta$ gox1067 $\Delta$ gox1068 $\Delta$ gox1857 $\Delta$ gox0585 $\Delta$ gox0586 $\Delta$ gox0587 $\Delta$ gox2094 $\Delta$ gox2095 $\Delta$ gox2096 $\Delta$ gox2097 $\Delta$ gox1230 $\Delta$ gox1231 $\Delta$ gox1232 $\Delta$ gox0265 $\Delta$ gox1441 $\Delta$ gox0854 $\Delta$ gox0855 $\Delta$ gox0516	Peters <i>et al.</i> (2013)
<i>Gluconobacter oxydans</i> $\Delta$ gox1687	Derivat von <i>G. oxydans</i> $\Delta$ hsdR; $\Delta$ gox1687, (Deletion von <i>gox1687</i> )	Kosciow <i>et al.</i> (2016)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (DSM 6897)	F, supE44, $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, $\phi$ 80d, lacZ $\Delta$ M15, endA1, hsdR17 ( <i>rk mk</i> <sup>+</sup> ), thi-1, $\lambda$ , recA1, gyrA96, relA1	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i> NEB 5-alpha	Derivat von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; <i>fhuA2</i> $\Delta$ (argF-lacZ)U169 <i>phoA glnV44</i> $\phi$ 80 $\Delta$ (lacZ)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> (DE3)	BL21 <i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> ( $\lambda$ DE3) [ <i>dcm</i> ] $\Delta$ hsdS $\lambda$ DE3 = $\lambda$ sBamHIo $\Delta$ EcoRI-B <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> $\Delta$ nin5	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.3.2 Medien und Zellanzucht

Alle Medien wurden bei 121 °C für 20 Minuten zur Sterilisation autoklaviert.

#### 2.3.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Die Kultivierung von *Escherichia coli* NEB 5 alpha und *Escherichia coli* BL21 (DE3) erfolgte in LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 180 rpm oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37 °C. Bei Kultivierung von Kulturen, die ein Expressionsplasmid enthielten, wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml oder Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) zum Medium hinzugegeben.

### Luria-Bertani/Lysogeny broth (LB)-Medium/-Platten (Maniatis, 1982):

Pepton tryptisch verdaut	10 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,5 mit 1 M HCl eingestellt. Beim Erstellen von LB-Platten wurde vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar hinzugegeben. Das LB-Medium wurde zum Ausplattieren von Kulturen sowie zur Anzucht von Vorkulturen und zur Proteinproduktion verwendet.

#### **2.3.2.2 Kultivierung von *G. oxydans*-Stämmen**

Die Kultivierung der *G. oxydans*-Stämme erfolgte, mit zwei Ausnahmen, in Hefe-Mannitol (YM)-Medium schüttelnd (180-200 rpm) bei 30 °C. Für den Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* wurde ein Hefe-Mannitol-Glukose (YMG)-Medium verwendet und der Stamm *G. oxydans* BP.9 wurde in Hefe-Fruktose (YF)-Medium kultiviert. Aufgrund der natürlichen Resistenz von *G. oxydans* gegen Cefoxitin wurden alle Medien mit Cefoxitin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt. Für die Kultivierung von Stämmen, die Expressionsplasmide trugen, wurde zusätzlich Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zu den Medien hinzugefügt. Da *G. oxydans* eine hohe Sauerstoffkonzentration im Medium benötigt, wurden die Stämme in Schikanekolben angezogen.

#### YM-Medium:

Hefe	6 g
Mannitol	20 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### YF-Medium:

Hefe	6 g
Fruktose	20 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### YMG-Medium:

Hefe	6 g
Mannitol	10 g
Glukose	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Bei Kultivierung von *G. oxydans*-Stämmen in YMG-Medium wurde diesem zusätzlich 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,8) hinzugefügt.

#### **2.3.3 Erstellen von Stammkulturen**

Zur Lagerung von generierten Stämmen wurden Stammkulturen erstellt, die bei -70 °C gelagert wurden. Die Kulturen wurden dazu bis zum Ende der exponentiellen Wachstums-

phase kultiviert. Anschließend wurden 800 µl einer Kultur mit 200 µl DMSO (100 %) versetzt und bei -70 °C eingefroren.

#### **2.3.4 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern**

Die Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen erfolgte photometrisch. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels Photometer bestimmt. Als Leerwert diente das unbeimpfte Medium, in dem die jeweilige Kultur kultiviert wurde. Lag der Wert der optischen Dichte über 0,3, wurde die Zellsuspension verdünnt, da bei Werten über 0,3 der lineare Zusammenhang zwischen Zellzahl und optischer Dichte aufgrund von Lichtstreuungsphänomenen nicht mehr gewährleistet ist. Die erhobenen Daten wurden logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen. Über den Verlauf der logarithmierten Wachstumskurve konnten die Wachstumsrate ( $\mu$ ) und Verdopplungszeit ( $t_d$ ) bestimmt werden. Die Wachstumsrate ergab sich aus der Steigung der logarithmierten OD ( $\ln OD_{600}$ ) im exponentiellen Wachstumsbereich und die Verdopplungszeit ließ sich über die Formel  $\ln(2)/\mu$  berechnen.

### **2.4 Biochemische Methoden**

#### **2.4.1 Transformation von *E. coli***

Die Transformation nach (Hanahan *et al.*, 1991) ist, neben Konjugation und Transduktion, eine von drei Arten des Gentransfers bei Prokaryoten und wurde hier dazu eingesetzt, Plasmide in kompetente *E. coli* NEB 5 alpha oder *E. coli* BL21 (DE3) zu übertragen. Bei der Inkubation auf Eis lagert sich die DNA an die Zellen an und wird bei einem darauffolgenden Hitzeschock in die Zellen aufgenommen.

Zu 20 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 5 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde für 15 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und die Zellen danach erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zum Transformationsansatz 800 µl LB- oder SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen wurden für 1-2 Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Jeweils 100 µl der Proben sowie deren, im Rückstand resuspendierten, Pellets wurden auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolite Repression):

1 M Glukoselösung	0,2 ml
Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	20,0 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
dH <sub>2</sub> O	ad 970 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml steril filtriertes 1 M MgCl<sub>2</sub> oder MgSO<sub>4</sub> zugegeben sowie 20 ml einer steril filtrierten 1 M Glukoselösung.

### **2.4.2 Elektroporation von *G. oxydans***

Die Methode der Elektroporation wurde nach einer modifizierten Methode von Mostafa *et al.* (2002) durchgeführt, um erstellte Expressionsplasmide in *G. oxydans*-Stämme einzubringen. *G. oxydans* wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 kultiviert. Zweimal 2 ml der Kultur wurden in sterilen 2 ml-Eppendorfgläsern bei 4 °C und 8000 rpm geerntet. Alle darauffolgenden Schritte wurden unter Kühlung der Proben auf Eis durchgeführt. Die Zellpellets wurden zweimal mit kaltem 1 mM HEPES-Puffer gewaschen und dann in 50 µl HEPES-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl des zu übertragenden Plasmids und 10 µl einer 75 %-igen Glycerol-Lösung zu den Ansätzen hinzugegeben. Die Elektroporationsansätze wurden in gekühlte Elektroporationsküvetten mit einer Elektrodendistanz von 1 mm überführt (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland). Die Elektroporation erfolgte dann in einem MicroPulser von BioRad (München, Deutschland), wobei die Zellen für 4-5 Millisekunden einem elektrischen Impuls von 2,2 kV ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration in 1 ml EP-Medium aufgenommen und in einem 15 ml-Falcon über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Nach erfolgter Regeneration wurden die Zellen pelletiert, die Pellets im Rückfluss resuspendiert und zur Selektion auf YM<sub>Cef/Kan</sub>-platten ausplattiert.

### EP-Medium (Elektroporationsmedium):

Mannitol	80 g
Hefeextrakt	15 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 g
Glycerol	0,5 g
CaCl <sub>2</sub>	1,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### **2.4.3 Proteinproduktion in *E. coli* BL21(DE) und *G. oxydans*-Stämmen**

Die Produktion der Ketofruktose-Reduktase wurde in *E. coli* BL21(DE) durchgeführt. Die Zellen wurden in 200 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen und dann mit 20 µl AHT (2 mg/ml) induziert (Endkonzentration 0,2 µg/ml). Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von 4 h bei 30 °C. Die Zellernte erfolgte bei 8000 rpm für 10 min. Das Zellpellet wurde in 10 ml Puffer W (vgl. 2.4.3.5) resuspendiert und bei -21 °C gelagert oder direkt mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Für die Proteinproduktion in *G. oxydans*-Stämmen wurden die Stämme, die das jeweilige Expressionsplasmid besaßen, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,2 in 500 ml YM-Medium (*G. oxydans* 621  $\Delta$ *hsdR*-Derivate) oder 500 ml YF-Medium (*G. oxydans* BP.9-Derivate) bei 30 °C und 180-200 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 8000 rpm geerntet und in 10 ml Puffer W (falls eine Proteinaufreinigung folgte) oder 10 ml 40 mM KPb (pH 7) (bei anschließender Membranpräparation oder Enzymtests an ganzen Zellen) resuspendiert.

#### **2.4.3.1 Zellaufschluss mittels Ultraschall**

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Ultraschallbeschallung wurde bei 4 °C über einen Zeitraum von 15 Minuten (1,5 min/ml) im Puls-Modus bei 50 %-iger Leistung in einem Branson Sonifier Cell Disrupter B15 durchgeführt (Heinemann Ultraschall und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland). Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Sorvallröhrchen überführt und für 35 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für die Aufreinigung periplasmatischer Proteine oder zur Präparationen der Membranen eingesetzt.

#### **2.4.3.2 Zellfraktionierung**

Um die Lokalisierung von Proteinen in der Zelle zu untersuchen, wurde eine Zellfraktionierung modifiziert nach Tsukada und Perlman (1972) durchgeführt, bei der die Cytoplasmafraktion und die Periplasmafraktion voneinander separiert werden. Der Stamm *G. oxydans* BP.9 *acry1741* wurde in 500 ml YF-Medium bei 30°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-1,2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (8000 rpm, RT, 15 min) und das Zellpellet bei RT für 20 min in 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 6,8 inkubiert, der außerdem 0,5 mM EDTA und 20 % Saccharose enthielt. Danach wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (8000 rpm, RT, 15 min) und in 50 ml eiskaltem 5 mM MgCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Zur zusätzlichen Lyse der Zellmembran wurde zudem Polymyxin B in einer Endkonzentration von 6,25 µg/ml hinzugefügt und die Suspension für 20 min auf Eis inkubiert. Die verbliebenen Sphäroplasten wurden dann durch Zentrifugation geerntet

(30 min, 4 °C, 5000 rpm). Das entstandene Pellet beinhaltete die cytoplasmatische Fraktion in Form von Sphäroplasten, welche anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden und der Überstand bildete die periplasmatische Fraktion.

#### **2.4.3.3 Präparation von Membranfraktionen**

Für die Membranpräparationen wurden Zellkulturen in YM- oder YF-Medium schüttelnd bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,2 angezogen und geerntet. Die Pellets wurden in 10 ml 40 mM KPB (pH 7) resuspendiert und mittels Ultraschallbeschallung aufgeschlossen (15 min, 50 % Amplitude). Anschließend wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm) und der Zellüberstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 45000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Membranpellets wurden mit KPB gewaschen. Nach erneuter Ultrazentrifugation (1 h, 45000 rpm, 4 °C) wurden die sedimentierten Membranen in 1-2 ml KPB aufgenommen, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

#### **2.4.3.4. Solubilisierung membranständiger Proteine**

Um membranständige Proteine aus den präparierten Membranen zu solubilisieren, wurden die Membranpellets nach der ersten Ultrazentrifugation in KPB resuspendiert (Abschnitt 2.4.5.4) und die Zellsuspension mit 1 % Triton X-100 versetzt. Dann wurden die Membranen auf Eis für 4 h oder über Nacht unter leichtem Rühren inkubiert. Nach der Inkubation, während der die membranständigen Proteine durch das Detergenz Triton X-100 aus den Membranen herausgelöst worden sind, wurde die Membranfraktion erneut bei 45000 rpm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand des zweiten Ultrazentrifugationsschrittes enthielt die solubilisierten Proteine und konnte für eine folgende Proteinaufreinigung verwendet werden.

#### **2.4.3.5 Aufreinigung von Proteinen über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung der produzierten Proteine erfolgte über ein Streptag II oder ein Streplong, welches N- oder C-terminal an die Proteine fusioniert wurde, sodass diese mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten. Hierzu wurde eine Säule (IBA BioTAGnology, Göttingen, Germany) mit 1 ml Säulenvolumen verwendet. Die Zellfraktion, die das aufzureinigende Protein enthielt, wurde auf das Säulenmaterial gegeben, sodass das Fusionsprotein über das Streptag-Motiv an die Strep-Tactin-Matrix der Säule binden konnte. Durch dreimaliges Waschen der Säule mit 3 ml Waschpuffer (Puffer W) wurden unspezifisch bindende Proteine und andere Kontaminationen entfernt. Anschließend wurde das Protein durch sechsmalige Zugabe von 500 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die Elution erfolgte durch das im Elutionspuffer enthaltene Desthiobiotin, welches eine größere Affinität zum Strep-Tactin besitzt als das Streptag-Motiv, sodass es das

Fusionsprotein von der Säule verdrängt. Zur Regeneration der Säule wurde diese dreimal mit 5 ml Regenerationspuffer gespült, wobei das Desthiobiotin durch das HABA von der Säule gelöst wird. Die Säule wurde bei 4 °C in 2 ml Waschpuffer gelagert. Alle Schritte wurden bei 10 °C durchgeführt. Vor dem erstmaligen Gebrauch der Säule wurde diese mit 2 ml Waschpuffer äquilibriert. Aufgereinigte Proteine wurden in Aktivitätstests eingesetzt oder bei -70 °C gelagert. Im Falle der Aufreinigung eines membranständigen Proteins wurden alle verwendeten Puffer zuvor mit 0,1 % Triton X-100 versetzt.

<u>Waschpuffer:</u>	<u>Elutionspuffer:</u>	<u>Regenerationspuffer:</u>
100 mM Tris-Cl pH 8	100 mM Tris-Cl pH 8	100 mM Tris-Cl pH 8
150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
	2,5 mM Desthiobiotin	1 mM HABA

#### **2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet, um den Proteingehalt einer Lösung zu bestimmen. Bei beiden Verfahren handelt es sich um photometrische Bestimmungen, bei denen es zu einer Komplexbildung zwischen Protein und einem Chromogen kommt, die eine Absorptionsänderung der Proteinlösung hervorruft. Der Bradford-Assay wurde hauptsächlich zur Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen eingesetzt. Der BCA-Test wurde lediglich bei sehr geringen Proteinkonzentrationen angewandt, die unter der Detektionsgrenze der Bradford-Methode lagen.

##### **2.4.4.1 Proteinbestimmung mittels BCA-Test**

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Test (Smith *et al.*, 1985) basiert auf der sogenannten Biuret-Reaktion.  $\text{Cu}^{2+}$  kann von Proteinen bei alkalischem pH zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden. Das  $\text{Na}^+$ -Salz der Bicinchoninsäure bildet mit den  $\text{Cu}^+$ -Ionen einen Komplex, der eine purpurne Farbe besitzt und somit photometrisch messbar ist. Als Referenz wurde eine Kalibrierungsreihe aus verschiedenen BSA-Konzentrationen (0,01-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) erstellt.

Für den Test wurde eine 96 Well Platte verwendet. Als Leerwert wurde der Puffer, in dem das Protein eluiert war, verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibriergerade mit BSA und Konzentrationen von 0,1-1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aufgenommen. Jeweils 25  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 250  $\mu\text{l}$  der AB-Lösung des BCA-Kits versetzt, die zuvor im Verhältnis Lösung A:Lösung B von 1:50 angesetzt wurde. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und dann die Absorption bei 552 nm mit Hilfe des Infinite M200 (TECAN, Crailsheim) gemessen. Der Leerwert sowie der Wert des Puffers wurden von den Messdaten abgezogen und mittels der Messdaten der BSA-Konzentrationen eine



Kalibriergerade erstellt, über deren Geradengleichung die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden kann. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung pro Proteinlösung durchgeführt.

#### **2.4.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Methode der Proteinbestimmung mittels Bradford (1976) basiert auf einer Komplexbildung zwischen Protein und dem Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau, der an die positiv geladenen und unpolaren Seitenketten von Proteinen bindet, was zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm führt. Die Proteinkonzentration einer Lösung kann dann über die Absorption der Lösung bei 595 nm bestimmt werden. Als Referenz wurde eine Kalibrierungsreihe aus verschiedenen BSA-Konzentrationen (0,05-1 mg/ml) erstellt. Für die Proteinbestimmung wurde 20 µl der proteinhaltigen Lösung mit 980 µl der Bradford-Reagenzes (Firma) versetzt und für 10 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration über die BSA-Eichgerade bestimmt.

#### **2.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Laemmli, (1970) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch Zugabe des Detergenz SDS, welche sich an hydrophobe Regionen von Aminosäuren anlagert (1,4 g SDS/g Protein), wird eine Maskierung der Eigenladung der Proteine und eine negative Nettoladung herbeigeführt. Zudem zerstört SDS, sowie das Aufkochen der Probe die native Struktur der Proteine, sodass es zu einer Linearisierung der Proteine kommt und eine Proportionalität zwischen Länge und Molekulargewicht entsteht. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach Größe, da sich kleine Proteine schneller durch das Gel bewegen als Proteine mit größerem Molekulargewicht. Intra- und intermolekulare Disulfidbrücken werden durch Reduktionsmittel, wie Mercaptoethanol, reduziert. Bei einer diskontinuierlichen SDS-Page werden zwei Gelschichten gegossen, ein Sammel- und ein Trenngel, die sich in ihrem prozentualen Acrylamidanteil unterscheiden. Das Sammelgel dient zur Fokussierung der Lauffront und das höher prozentige Trenngel zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Das Polyacrylamidgel besteht aus Acrylamid und Bisacrylamid, deren Polymerisation durch Zugabe von APS (Radikalstarter) und TEMED (Polymerisationskatalysator) gestartet wird. Sobald dann eine elektrische Spannung über das Gel gelegt wird, wandern die negativ geladenen Proteine zur positiven Elektrode. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug 5 % (w/v) und die Konzentration des

Trenngels 12,5 % (w/v). Vor Beladen des Gels wurden die Proben 1:1 mit Ladebuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Als Marker wurden 5 µl des Page Ruler Prestained Protein Ladders von Thermo Scientific aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte anschließend bei 60 V im Sammelgel und 100 V im Trenngel in 1 x Elektrodenpuffer. Anschließend wurden die Gele für Western-Blot-Analysen genutzt oder einer Silberfärbung unterzogen.

	<u>12,5 % Trenngel:</u>	<u>5 % Sammelgel:</u>
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 40)	2 ml	250 µl
Trennpuffer	1,2 ml	-
Sammelpuffer	-	400 µl
SDS (0,5 %)	1,2 ml	400 µl
dH <sub>2</sub> O	1,6 ml	950 µl
TEMED	5 µl	5 µl
APS (10 %)	30 µl	30 µl

Trennpuffer:

Tris 22,77 g  
dH<sub>2</sub>O ad 100 ml  
pH 8,8 , eingestellt mit HCl

Sammelpuffer:

Tris 7,57 g  
dH<sub>2</sub>O ad 100 ml  
pH 6,8, eingestellt mit NaOH

0,5 % SDS-Lösung:

SDS 0,5 g  
dH<sub>2</sub>O ad 100 ml

10 % APS-Lösung:

APS 0,1 g  
dH<sub>2</sub>O ad 1 ml

1 x Elektrodenpuffer:

Tris 3,0 g  
Glycin 14,4 g  
SDS 1,0 g  
dH<sub>2</sub>O ad 1000 ml  
pH 8,3, eingestellt mit HCl

Ladebuffer:

Sammelpuffer 2,0 ml  
1 % Bromphenolblau in EtOH 0,1 ml  
2-Mercaptoethanol 0,5 ml  
Glycerin 5,0 ml  
dH<sub>2</sub>O ad 10 ml

### 2.4.6 Silberfärbung

Die Anfärbung der Proteine im SDS-Gel erfolgte mit Hilfe einer Färbemethode nach Blum *et al.* (1987), die auf der Anlagerung von Silberionen an die negativen Seitenketten der Aminosäuren basiert. Durch anschließende Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber, werden die Proteinbanden im Gel sichtbar. Die Silberfärbung weist mit einer Nachweisgrenze von 0,1 bis 1 ng Protein eine hohe Sensitivität auf.

Das SDS-Gel wurde nach der Gelelektrophorese mit dH<sub>2</sub>O abgespült und für 20 min in Fixierlösung unter Schütteln inkubiert. Hierbei werden die Proteine denaturiert und im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel für 10 min in 50 %-iges Methanol überführt und dann für

10 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte eine ein-minütige Inkubation in einer Thiosulfatlösung, wodurch freie, nicht durch Proteine besetzte Stellen im Gel maskiert wurden. Durch zweimaliges Waschen des Gels für 1 min in dH<sub>2</sub>O wurde überschüssiges Thiosulfat entfernt. Bei einer anschließenden 30-minütigen Inkubation des Gels in der Imprägnierlösung bei 4 °C in Dunkelheit, lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativen Seitenketten der Proteine an. Durch die Überführung des Gels in die Entwicklerlösung werden die Silberionen aufgrund des Formaldehyds zu elementarem Silber reduziert und es kommt zu einer dunklen Anfärbung der Proteine. Die verwendeten Lösungen wurden vor Färbebeginn frisch angesetzt.

Fixierlösung:

Methanol	500 ml
Essigsäure (100 %)	120 ml
Formaldehyd (37 %)	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Methanol-Lösung (50 %):

Methanol	25 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

Thiosulfatlösung (0,02 %):

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,01 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

Imprägnierlösung:

AgNO <sub>3</sub>	0,05 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

Entwicklerlösung:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,5 g
Formaldehyd (37 %)	0,05 ml
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,004 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

#### 2.4.6 Spezifische Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Der Western Blot ist eine von Towbin *et al.* (1979) entwickelte Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen. Die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Blotting). Die Proteindetektion erfolgt über ein Streptactin-Konjugat, welches gegen das mit dem Protein fusionierte Streptag II-Motiv gerichtet ist. An das Streptactin-Konjugat ist eine Merrettich-Peroxidase gekoppelt. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgt dann durch Zugabe eines bestimmten Substrats, das von der Peroxidase umgesetzt wird, wobei es zu einer Farbreaktion kommt.

Das Proteineluat wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel, sowie Whatmanpapier und die Nitrocellulose-Membran (4,5 µM; Bio-Rad, München, Deutschland)

wurden in Towbin-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot wie folgt luftblasenfrei zusammengesetzt: drei Schichten Whatmanpapier, die Nitrocellulosemembran, das Gel, gefolgt von drei Schichten Whatmanpapier. Für den Elektrotransfer der Proteine auf die Membran wurde für 30-45 Minuten (je nach Proteingröße) eine elektrische Spannung von 15 V angelegt. Als Blotgerät wurde ein Mini-Semidry-Blotter (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) verwendet. Nach erfolgter Übertragung der Proteine auf die Membran wurde diese für eine Stunde in 20 ml Blockierlösung inkubiert und dann dreimal für 5 min in jeweils 20 ml PBT-Puffer gewaschen. Nach den Waschschrritten wurde die Membran für 1,5 h oder über Nacht mit dem HRP-gekoppelten Strep-Tactin-Konjugat (IBA, Göttingen) inkubiert und danach dreimal für 1 min mit je 20 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 200 µl Chloronaphthol-Lösung sowie 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %).

#### 2.4.7 Herstellung und Substratumsatz ruhender Zellen

Ruhende Zellen wurden zur Untersuchung der Substratumsetzung eines Stammes eingesetzt. Für die Herstellung ruhender Zellen wurde eine Zellkultur des jeweiligen *G. oxydans*-Stammes (*G. oxydans* Δ1687 mit dem Plasmid pBBR1p264-*sacC-fdh*, *G. oxydans* Δ1687 mit dem Plasmid pBBR1p264-*sacC-p264-fdh* und *G. oxydans* Δ1687 mit dem Plasmid pBBR1p264-*sacC-p265-fdh*) erstellt und diese bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann mittels Zentrifugation pelletiert (8000 rpm, 10 min, RT) und einmal mit 1 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in 47,5 ml Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Um den Umsatz von Fruktose und Saccharose zu testen wurde den Zellsuspensionen 20 mM Fruktose- bzw. 20 mM Saccharose-Lösung zugegeben. In regelmäßigen Abständen wurden Proben der Zellsuspension

##### Towbinpuffer:

Tris Base	1,52 g
Glycin	7,2 g
Methanol	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
pH 8,3, nicht titrieren	

##### PBS-Puffer(Phosphate Buffered Saline):

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,256 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
dH <sub>2</sub> O	auf 1 l

##### PBS-Blockierlösung:

5 % (w/v) Milchpulver in PBS-Puffer

##### PBS-Tween-Puffer:

0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS-Puffer

##### Chloronaphthollösung:

3 % (w/v) 4-Chloro-1-naphthol in Methanol

##### Wasserstoffperoxidlösung:

30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

entnommen und der Kulturüberstand mittels HPLC und Ketofruktose-Reduktase-Test auf die vorhandenen Substrate und Produkte untersucht.

## **2.4.8 Enzymaktivitätstests**

### **2.4.8.1 Enzymaktivitätstests an ganzen Zellen**

Kulturen der BP.9-Mutante ohne Plasmid sowie der BP.9-Mutante, die Plasmide mit den zu charakterisierenden Dehydrogenasen enthielten, wurden in 50 ml YF-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 1-1,2 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (8000 rpm, 15 min, RT), zwei Mal mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) gewaschen und anschließend in selbigem Puffer resuspendiert, sodass die Zellsuspensionen eine  $OD_{600}$  von 4 aufwiesen. Für die Enzymassays wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension, 20 mM Substrat, sowie entweder Hexacyanoferrat(III) (1 mM) oder 0,15 mM DCPIP/0,65 mM PMS als Elektronenakzeptoren in eine 96-Wellplatte pipettiert und mit KPB zu einem Totalvolumen von 200  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend wurden die Extinktion bei 420 nm (Hexacyanoferrat(III)) oder 600 nm (Phenazinmethosulfat (PMS)/2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP)) in Intervallen von 2 min, über einen Zeitraum von 30 min oder 24 h aufgezeichnet. Über die Extinktionsabnahme pro Minuten konnte ermittelt werden, ob es Unterschiede bezüglich der Umsatzgeschwindigkeit von Substraten zwischen der BP.9-Mutante ohne Plasmid und den BP.9-Mutanten mit dem Expressionsplasmid gab.

### **2.4.8.2 Bestimmung der Aktivität FAD- und PQQ-abhängiger Enzyme**

Um Unterschiede in den Enzymaktivitäten der Membranen von Stämmen, welche die, für die zu charakterisierenden Dehydrogenasen kodierenden, Gene auf Expressionsplasmiden trugen, im Vergleich zu Kontrollstämmen zu finden, wurden Enzymaktivitätstests an Membranen durchgeführt. Auf diese Weise sollten Hinweise zur Funktion der nicht charakterisierten Dehydrogenasen sowie die Aktivität des Fdh-Komplexes in unterschiedlichen Organismen untersucht werden. Zur Bestimmung des Substratspektrums der unbeschriebenen Dehydrogenasen sowie der spezifischen Aktivität des Fdh-Komplexes, wurden in die Enzymaktivitätstests Membranfraktionen (2-5  $\mu$ g) eingesetzt. Für die Bestimmung der Aktivität PQQ-abhängiger Enzyme wurden die artifiziellen Elektronenakzeptoren 0,65 mM Phenazinmethosulfat (PMS) und 0,15 mM 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) eingesetzt. Die zu untersuchenden Substrate wurden in einer Konzentration von 20 mM oder 30 mM eingesetzt, mit Ausnahme der Aktivitätstests mit YliI, wo die Substratkonzentrationen zwischen 100 und 500 mM lagen. Die Enzymaktivitätstests wurden in 40 mM KPb pH 7 bei 30 °C durchgeführt und es wurden 1 ml-Plastikküvetten für die Messungen verwendet (Carl Roth GmbH,

Karlsruhe, Deutschland). Die Reduktion des Endakzeptors DCPIP wurde photometrisch bei 600 nm mit dem Photometer Jasco V-600 (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) aufgezeichnet. Für die Bestimmung der Extinktionsabnahme ( $\Delta E$ ) wurde das Programm Spectra Manager III verwendet. Über die Extinktionsabnahme konnte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die spezifische Aktivität in U/mg Membranprotein berechnet werden. Eine Unit (U) ist definiert als Enzymmenge, die 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute umsetzt. Das Absorptionsmaximum von DCPIP variiert je nach pH-Wert, bei dem die Messung durchgeführt wird (Armstrong, 1964; Hölscher *et al.*, 2007). Bei einem pH-Wert von 7 liegt der Extinktionskoeffizient von DCPIP bei  $21 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase wurde in 50 mM McIlvaine Puffer pH 4,5 mit 20 mM Fruktose und 1 mM Hexacyanoferrat(III) nach Ameyama *et al.* (1981) durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient von Hexacyanoferrat(III) liegt bei  $12,5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  und die Reduktion des Elektronenakzeptors wurde bei 420 nm aufgezeichnet. Pro Ansatz wurden 0,2-0,5  $\mu\text{g}$  des aufgereinigten Enzyms eingesetzt. Der Aktivitätstest wurde bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Volumenaktivität sowie die spezifische Aktivität wurden mit Hilfe folgender Formeln bestimmt:

$$\text{Volumenaktivität } \left[ \frac{U}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V}{d \times \varepsilon \times v}$$

$$\text{Spezifische Aktivität } \left[ \frac{U}{\text{mg}} \right] = \text{Volumenaktivität } \frac{\left[ \frac{U}{\text{ml}} \right]}{C_{\text{Prot}}}$$

mit  $\Delta E / \text{min}$  = Änderung der Extinktion pro min  
 $V$  = Gesamtvolumen des Testansatzes [ml]  
 $d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]  
 $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient [ $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]  
 $v$  = eingesetztes Volumen des Enzyms [ml]

### 2.4.8.3 Enzymaktivitätstests mit NADH/NADPH- und $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ - abhängiger Enzyme

Die Aktivitätstests NADH/NADPH- und  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ - abhängiger Enzyme wurden in 40 mM KPB mit einem pH-Wert von 7 und  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Substrate wurden in einer Konzentration von 20-30 mM eingesetzt und die Konzentration des Cofaktors NADH/NADPH oder  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  betrug  $2,5 \mu\text{M}$ . Um die spezifische Aktivität von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-abhängigen Enzymen zu bestimmen, wurde die Absorptionsänderung von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> bei 340 nm ( $\varepsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mit dem Photometer Jasco V-600

(Jasco, Gross-Umstadt, Germany) aufgezeichnet. Über die Extinktionsdifferenz über die Zeit ( $\Delta E/\text{min}$ ), die mit der Software Spectra Manager III ermittelt wurde, konnte dann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die spezifische Aktivität in U/mg berechnet werden.

#### **2.4.8.4 Enzymkinetik**

Die Enzymaktivitätstests für die Bestimmung der maximalen spezifischen Aktivität ( $V_{\text{max}}$ ) und der Michaelis-Konstanten ( $K_M$ ) wurden bei 30 °C in 40 mM KPB (pH 7) durchgeführt. Zur Bestimmung der Enzymparameter wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik für das jeweilige Substrat aufgezeichnet, indem die spezifische Aktivität, bei variierender Substratkonzentration und gleichbleibender Enzymmenge, bestimmt wurde. Anschließend wurden  $V_{\text{max}}$  sowie der  $K_M$ -Wert über eine reziproke Darstellung der Michaelis-Menten-Daten (Lineweaver-Burk-Darstellung) vorgenommen, sodass eine lineare Regression zwischen Substratkonzentration und spezifischer Aktivität entsteht und  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$ -Wert rechnerisch, über die Gleichung ( $y = m * x + b$ ) der Regressionsgeraden, bestimmt werden können.

#### **2.4.8.5 Aufnahme von UV/VIS-Spektren**

Zum Nachweis von prosthetischen Gruppen wurden UV/VIS-Spektren mit Hilfe eines Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) aufgenommen. Die Messung erfolgte in einer Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics, Müllheim/Deutschland) und 100  $\mu\text{l}$  Proteineluat wurden eingesetzt. Als Blank wurde Elutionspuffer verwendet. Das Spektrum wurde innerhalb der Wellenlängen 250 nm bis 800 nm, mit Intervallen von 0,2 nm, aufgezeichnet. Die Aufnahme und Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Spectra Manager III.

#### **2.4.8.6 Rekonstitution PQQ- abhängiger Enzyme**

PQQ ist als Cofaktor essentiell für die Funktionalität PQQ-abhängiger Dehydrogenasen. Der Cofaktor wird im Periplasma der Zelle in das Protein eingebaut. Es ist jedoch auch möglich, das Einfügen des PQQ ins Protein *in vitro* durchzuführen. Hierfür wurden 3-5  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Enzyms in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) gegeben. Anschließend wurde dem Ansatz 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , welches essentiell für die Bindung des PQQs an das Enzym ist, sowie 5  $\mu\text{M}$  PQQ hinzugefügt und das Protein bei RT für 10 min inkubiert. Nach erfolgter Rekonstitution konnte der Ansatz in Enzymaktivitätstests eingesetzt werden.

## 2.4.9. Wachstumsexperimente

### 2.4.9.1 Wachstumsversuche mit Fruktose als C-Quelle

Um das Wachstumsverhalten des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* zu analysieren sowie die Effizienz der Umsetzung von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose zu bestimmen, wurden Wachstumsversuche mit 100 mM Fruktose als C-Quelle durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR eingesetzt. Jeweils 100 ml YF-Medium mit 100 mM Fruktose als C-Quelle wurden mit über Nacht angezogenen Vorkulturen von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* angeimpft, sodass die Start-OD<sub>600</sub> zwischen 0,05 und 0,06 lag. Die Kulturen wurden bei 30 °C unter Schütteln (180-200 rpm) inkubiert und in regelmäßigen Abständen von 1,5 – 2 h, über einen Zeitraum von 55 h Proben der Kulturüberstände genommen und mittels HPLC und Ketofruktose-Reduktase-Test analysiert.

### 2.4.9.2 Wachstumsversuche mit Saccharose als C-Quelle

Für die Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose aus Saccharose wurde mit Hilfe des 2-Stamm-Systems ein Wachstumsversuch mit 50 mM Saccharose und 10 mM Glukose als C-Quelle durchgeführt. Der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ I687 *sacC* wurde in YM-Medium und der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* in YMG-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Stämme im Verhältnis 1:1 mit einem Endvolumen von 53 ml vereint. Als Substrat wurde 3 ml einer 1 M Saccharose-Lösung (Endkonzentration von 50 mM) und 3 ml einer 0,2 M Glukose-Lösung (Endkonzentration von 10 mM), sowie 3,6 ml 1 M KBP pH 6,8 (Endkonzentration von 60 mM) zur Pufferung des Systems zu der Mischkultur hinzugegeben. Die Mischkultur wurde bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und in Abständen von 2 h wurden Proben des Kulturüberstandes gezogen. Die Proben wurden aufbereitet (Vgl. 2.4.10.3) und mittels HPLC analysiert.

Für die Wachstumsversuche des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ I687, der entweder das Plasmid pBBR1p264-*sacC*-*fdh*-Strep oder das Plasmid pBBR1p264*sacC*p264*fdh* zur Co-Produktion der Sucrase SacC und des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes besaß, wurden Vorkulturen in YM-Medium angesetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-1,2 inkubiert. Für die Wachstumsversuche wurden je 40 ml Y-Medium mit 2,5 ml einer 1 M Saccharose-Lösung (Endkonzentration 50 mM) und 0,5 ml einer 1 M Glukose-Lösung (Endkonzentration 10 mM), sowie mit 2,5 ml 1 M KBP pH 6,8 versetzt und mit 5 ml der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden für 50 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. In Abständen von 2 h wurden Proben genommen und mittels HPLC analysiert.



### **2.4.9.3 Wachstumsversuche auf Zuckerrübenextrakt**

Zuckerrüben nutzen als Hauptspeicherstoff Saccharose. Um zu testen, ob mit Hilfe des 2-Stamm-Systems die im Zellsaft der Zuckerrübe vorliegende Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose umgewandelt werden kann, ohne vorhergehende Aufbereitung bzw. Aufreinigung des Substrats, wurde ein Wachstumsversuch auf Zuckerrübenextrakt durchgeführt. 1,4 kg Zuckerrübe wurden zerkleinert, mit 750 ml H<sub>2</sub>O versetzt und autoklaviert. Die entstandene Zuckerrübenmasse wurde mit Hilfe eines Stofftuches und Sieben ausgepresst und Feststoffe aus dem Zellsaft entfernt. Anschließend wurde der Zellextrakt erneut autoklaviert und für Wachstumsversuche eingesetzt. 49 ml des Zellextraktes wurden mit 1 ml Hefeextrakt (100 g/l), sowie Kanamycin und Cefoxitin versetzt. Kulturen der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687 sacC* und *G. oxydans*621H  $\Delta$ *hsdR fdh* wurden in YM- bzw. YMG- Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 schüttelnd bei 200 rpm und 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Zellextrakt 1:1 mit jeweils 5 ml der zwei Kulturen angeimpft. Für anschließende HPLC-Analysen wurden in einem Abstand von 2 h Proben des Überstandes entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert (3 min, 12000 rpm), der Überstand mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße: 0,45 µm) filtriert, 1:10 mit 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verdünnt und mittels HPLC analysiert. Des Weiteren wurde der pH-Wert der Kulturen in regelmäßigen Abständen bestimmt und 1 M CaCO<sub>3</sub> zur Kultur hinzugegeben, wenn der pH-Wert unter 5 fiel.

### **2.4.10 Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen in Kulturen**

#### **2.4.10.1 <sup>13</sup>C NMR-Spektroskopie**

Um zu überprüfen, dass es sich bei dem Oxidationsprodukt von Fruktose um 5-Keto-D-Fruktose handelt wurde ein <sup>13</sup>C NMR-Spektrum aufgenommen. Hierfür wurde der Überstand der Kultur von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* nach dem Wachstumsversuch auf Fruktose (vgl. 2.4.9.1) lyophilisiert und ca. 0,5 g des getrockneten Überstandes in 500 µl D<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Suspension wurden 5 mg Trimethylsilyl-Propionat-Natriumsalz (TMSP) und 10 µl Acetonitril (ACN) als interne Standards versetzt. Das NMR-Spektrum wurde mit Hilfe eines Bruker Avance DPX-Geräts bei 75 MHz aufgezeichnet und mit der Software TopSpin 1.3 und den Peaks der Standards TMSP ( $\delta$ c = 0 ppm) und ACN ( $\delta$ c = 3.61 ppm, 121.8 ppm) analysiert.

#### **2.4.10.2 5-Keto-D-Fruktose-Nachweis mittels Ketofruktose-Reduktase-Test**

Der Ketofruktose-Reduktase-Test wurde als enzymatische Nachweismethode von 5-Keto-D-Fruktose eingesetzt. Die Messung erfolgte in 40 mM KPB (pH 7) bei 30 °C. Als Cofaktor

wurde NADPH in einer Endkonzentration von 0,25 mM eingesetzt. Als Substrat dienten Kulturüberstände, oder Lebensmittelproben, die zuvor 1:5 oder 1:10 verdünnt bzw. in H<sub>2</sub>O gelöst wurden. Puffer, Substrat und NADPH wurden in eine 1 ml Küvette gegeben und bei 340 nm eine Grundlinie aufgezeichnet. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms (2-3 µg) gestartet und die Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen. Mit Hilfe der Steigungsabnahme pro Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) und des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann die Konzentration des oxidierten NADP berechnet werden. Da pro reduziertem Molekül 5-Keto-D-Fruktose ein Molekül NADPH umgesetzt wird, ist die Konzentration an oxidiertem NADP identisch mit der Konzentration der 5-Keto-D-Fruktose im Versuchsansatz.

#### **2.4.10.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Um das Produktspektrum zu bestimmen, das bei Wachstumsversuchen und Versuchen zum Substratumsatz an ruhenden Zellen gebildet wurde, wurden die Kulturüberstände mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie analysiert. Dafür wurden Kulturüberstände abzentrifugiert, filtriert (0,45 µm, Minisart Filter, Sigma Aldrich) und 1:5 oder 1:10 mit 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verdünnt. Anschließend wurde die Probe auf eine Aminex-HPX87H-Säule (300 x 7,8 mm; Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetragen. Als mobile Phase wurde 5 mM Schwefelsäure verwendet. Die Auftrennung von Saccharose, Fruktose, Glukose, Acetat und Glukonat erfolgte bei 21 °C mit einer Flussrate von 0,3 ml/min oder 0,6 ml/min. Für die Auftrennung der Keto-Verbindungen 5-Keto-D-Fruktose, 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat betrug die Säulentemperatur 65 °C mit einer Flussrate von 0,3 ml/min. Das verwendete HPLC-System stammt von der Firma Knauer (Berlin, Deutschland). Die Detektion der Produkte erfolgte mittels UV- und RI-Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland). Mit Hilfe von kommerziellen Standards wurden Kalibriergeraden für die erwarteten Produkte (Glukonat, Glukose, Fruktose, Saccharose, 5-Keto-D-Fruktose, 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat) in einem Bereich von 5-50 mM erstellt. Zur Auswertung der Daten wurde die Software ChromGate Client (Version 3.1.7) verwendet.

#### **2.4.11 Verwendete Programme und bioinformatische Methoden**

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden von den Datenbanken NCBI (National Center for Biotechnology Information) und KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.genome.jp/kegg/>) bezogen. Zum Vergleich von Gen- und Proteinsequenzen wurde das Programm Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) von EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute) verwendet (Li *et al.*, 2015; McWilliam *et al.*, 2013; Sievers *et al.*,

2011). Virtuelle Klonierungen wurden mit Hilfe des Programmes Clonemanager 9 (Scientific & Educational Software, USA) simuliert sowie Plasmidkarten der Expressionsplasmide erstellt. Zur Identifizierung homologer Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden verschiedene NCBI BLAST-Programme (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997) verwendet. Die Übersetzung von Nukleotid- in Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) von ExPASy durchgeführt und biochemische Parameter wie Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt wurden mit dem Programm ProtParam, ebenfalls von ExPASy, (<http://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt. Zur Vorhersage von Signalpeptiden und Transmembranhelices wurden die Programme SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>) und der TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) verwendet. Des Weiteren wurde für die Vorhersage von Sekundärstrukturen, Co-Faktoren und Bindemotiven die bioinformatischen Programme Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Buchan *et al.*, 2013; Jones, 1999), InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) und Pfam 27.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) verwendet (Hunter *et al.*, 2012; Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Finn *et al.*, 2014). Die Modellierung dreidimensionaler Proteinstrukturen wurde mit dem Programm Cn3D 4.3 durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang *et al.*, 2000). Die lineare und nicht lineare Regression der Michaelis-Menten-Kinetik und des Lineweaver-Burk-Plots wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 7.03 angefertigt.

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Word 2010 (Microsoft Office 2010) angefertigt. Für das Zitieren von Literaturquellen wurde das Programm Citavi5 (Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn) verwendet. Graphen und Diagramme wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office 2010) erstellt. Für die Bildbearbeitung wurde das Programm Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, USA) eingesetzt.

### 3) Ergebnisse

*G. oxydans* verfügt über eine Vielzahl an membrangebundenen Dehydrogenasen, die Polyole, Alkohole und Zucker effizient regio- und stereospezifisch umsetzen (Deppenmeier und Ehrenreich, 2009). Da viele dieser Enzyme, sowie Oxidoreduktasen anderer Essigsäurebakterien und verschiedener  $\alpha$ -Proteobakterien bereits industriell genutzt werden, war es von großem Interesse, weitere neuartige Flavin- oder PQQ-abhängige Dehydrogenasen in Hinblick auf einen potentiellen Einsatz in industriellen Fermentations- und Syntheseprozessen zu identifizieren und zu charakterisieren.

#### 3.1 Identifizierung neuartiger membranständiger und periplasmatischer Oxidoreduktasen

Für die Identifizierung bislang nicht biochemisch charakterisierter Flavin- oder PQQ-abhängiger Oxidoreduktasen wurden zunächst Blastp-Analysen durchgeführt (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dadurch wurden Proteine identifiziert, die strukturelle und funktionale Homologien zu bereits charakterisierten Enzymen aufwiesen. Die Homologien sollten nicht zu groß sein, um möglichst Enzyme mit neuartigen Substratspektren zu identifizieren. Dabei wurden die Aminosäuresequenzen membranständiger Flavin- oder PQQ-abhängiger Dehydrogenasen aus *G. oxydans*, *G. diazotrophicus* und *Sphingomonas (S.) wittichii* sowie die Aminosäuresequenzen periplasmatischer PQQ-Dehydrogenasen aus *E. coli*, *Komagataeibacter (K.) europaeus* und *Ketogulonicigenium (K.) vulgare* für die Blastp-Analysen verwendet (Tab.4).

Die Blastp-Analysen der oben genannten Proteine ergaben eine große Anzahl an homologen Sequenzen aus denen bislang nicht charakterisierte Proteine mit den prosthetischen Gruppen PQQ oder FAD zur weiteren Analyse ausgewählt wurden. Tabelle 5 stellt die mittels Blastp-Analysen ermittelten, zur Klonierung und Produktion ausgewählten, Oxidoreduktasen dar. Zusätzlich zu den nicht charakterisierten Dehydrogenasen aus *G. oxydans* wurden Proteine der Mikroorganismen *Acetobacter (A.) pasteurianus*, *Acidiphilium (A.) cryptum*, *S. wittichii* und *Gluconobacter (G.) japonicus* für eine Proteinproduktion und Charakterisierung ausgewählt. Die Aminosäuresequenzen der ausgewählten Proteine wurden bioinformatisch analysiert (Tab. 5). Der Server TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) und das Programm Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) wurden zur Berechnung der Transmembranhelices genutzt.

**Tabelle 4:** Periplasmatische und membrangebundene Dehydrogenasen aus  $\alpha$ -Proteobakterien, deren Aminosäuresequenzen für Blastp-Analysen verwendet wurden

Organismus	Gen	Annotation	Lokalisierung	prothetische Gruppe
<i>G. oxydans</i>	<i>gox_0256</i>	Glukose-Dehydrogenase	membranständig	PQQ
	<i>gox_1441</i>	nicht charakterisierte Dehydrogenase	membranständig	PQQ
	<i>gox_0561</i>	nicht charakterisierte Dehydrogenase	membranständig	PQQ
	<i>gox_1067-1068, gox_0756</i>	Alkohol-Dehydrogenase	membranständig	PQQ, Häm <i>c</i>
	<i>gox_1857</i>	Inositol-Dehydrogenase	membranständig	PQQ
	<i>gox_2094-2097</i>	Sorbitol-Dehydrogenase	membranständig	PQQ, FAD
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_3764</i>	putat. Sorboson-Dehydrogenase	membranständig	PQQ
<i>E. coli</i>	<i>ylil</i>	Aldose-Dehydrogenase	periplasmatisch	PQQ
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_1441</i>	putat. Alkohol-Dehydrogenase	membranständig	PQQ, Häm <i>c</i>
	<i>swit:4395</i>	Aldehyd-Dehydrogenase	periplasmatisch	PQQ
<i>K. europaeus</i>	<i>koeu_10270</i>	putat. L-Sorboson-Dehydrogenase	periplasmatisch	PQQ
<i>K. vulgare</i>	<i>sndH</i>	Sorboson-Dehydrogenase	membranständig	PQQ, Häm <i>c</i>
	<i>eio_0653</i>	Sorbose-Dehydrogenase	periplasmatisch	PQQ

Das Vorhandensein von Signalpeptiden wurde mit den Programmen SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Phobius und TatP1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) analysiert und eventuell vorhandene prothetischen Gruppen mit Hilfe des Servers Uniprot identifiziert (<http://www.uniprot.org/>). Die löslichen Dehydrogenasen wiesen eine Proteingröße von 20 – 75 kDa auf, wohingegen die Proteingrößen der membranständigen Dehydrogenasen 50 – 90 kDa betragen. Analysen der Topologie der membranintegralen Proteine durch das Programm TMHMM zeigten, dass diese mehrheitlich über fünf Membranhelices verfügen, die die cytoplasmatische Membran durchspannen. Lediglich für die Cytochrom *c*-Untereinheit des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes sowie für die putative Sorboson-Dehydrogenase Gdi3764 wurde nur eine Transmembranhelix angezeigt, über die die Proteine in die cytoplasmatische Membran integriert sind. Außer der Oxidoreduktase Gox1630 aus *G. oxydans* und dem Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* NBRC3260, die beide FAD als prothetische Gruppe besitzen, waren alle anderen Enzyme PQQ-abhängig. Bei einigen Dehydrogenasen konnte zusätzlich ein Bindemotiv für ein Häm *c* als prothetische Gruppe gefunden werden.

Die Produktion der neuartigen Dehydrogenasen sollte anschließend im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* durchgeführt werden, da dieser Organismus auf die Produktion PQQ-abhängiger Dehydrogenasen, im besonderen membrangebundener Enzyme, spezialisiert ist. *G. oxydans* verfügt selbst über eine Vielzahl an PQQ-abhängiger, membranständiger Dehydrogenasen sowie über das, für die PQQ-Synthese erforderliche, pqqA-E Operon (Prust *et al.*, 2005; Deppenmeier und Ehrenreich, 2009). Des Weiteren ist der Organismus genetisch und biochemisch gut untersucht und Expressionssysteme zur Produktion membranständiger Dehydrogenasen sind etabliert (Kallnik *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2013). *E. coli*, der oft für Proteinproduktionen verwendet wird, besitzt hingegen nur wenige PQQ-abhängige Enzyme und ist zudem nicht in der Lage PQQ zu synthetisieren (Yamada *et al.*, 2003). Darüber hinaus führt die Produktion membranständiger Enzyme in *E. coli* oftmals zur Bildung von Einschlusskörpern oder zu einem nicht korrekten Einbau der Proteine in die cytoplasmatische Membran, sodass sich dieser Organismus nicht für die Produktion PQQ-abhängiger Proteine anbietet (Baneyx und Mujacic, 2004).

**Table 5:** Bioinformatische Analyse von löslichen und membranständige Dehydrogenasen (DH), die Homologien zu charakterisierten Dehydrogenasen aus  $\alpha$ -Proteobakterien besitzen (Tab. 4). Die Proteingröße wurde ohne Einbezug des Signalpeptids berechnet und unter Berücksichtigung des fusionierten Strep-Tags.

Organismus	Gen	Annotation	Lokalisierung	Gengr.[bp]	TMH	Proteingr. [kDa]	prothetische Gruppe
<i>G. oxydans</i>	<i>gox_1630</i>	Oxidoreduktase	cytoplasmatisch	978	-	59	FAD
	<i>gox_0516</i>	PQQ-abhäng. DH	membranständig	2472	5	89,3	PQQ
	<i>gox_1441</i>	PQQ-abhäng. DH	membranständig	2421	5	87,8	PQQ
	<i>gox_1857</i>	Inositol-DH	membranständig	2367	5	88,7	PQQ
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_1961</i>	putat. Sorbitol-DH	membranständig	2352	5	86,5	PQQ
	<i>swit_0721</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	2109	-	72,7	PQQ, Häm C
	<i>swit_1001</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	2097	-	70,5	PQQ, Häm C
	<i>swit_1054</i>	putat. Glukose-DH	periplasmatisch	2010	-	71	PQQ
	<i>swit_2227</i>	putat. Ethanol-DH Typ1	periplasmatisch	2022	-	73,2	PQQ, Häm C
	<i>swit_1323</i>	putat. Pva-DH	periplasmatisch	1836	-	66,1	PQQ, Häm C
	<i>swit_1441</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	2127	-	73,6	PQQ, Häm C
	<i>swit_4160</i>	PQQ-abhäng. Protein	periplasmatisch	2073	-	71,5	PQQ, Häm C
<i>A. cryptum</i>	<i>acry_2797</i>	PQQ-abhäng. Protein	periplasmatisch	1674	-	56,1	PQQ
	<i>acry_1741</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	1713	-	58,7	PQQ
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_1529</i>	putat. Sorbose-DH	periplasmatisch	1596	-	57,6	PQQ
	<i>gdi_3764</i>	putat. Sorboson-DH	membranständig	1400	1	53,4	PQQ
<i>G. japonicus</i>	<i>fdhL</i>	Fruktose-DH, gr UE	periplasmatisch	1631	-	61,3	FAD
	<i>fdhS</i>	Fruktose-DH, kl UE	periplasmatisch	552	-	16,8	-
	<i>fdhC</i>	Fruktose-DH, Cyt C	membranständig	1461	1	49,4	Häm C
<i>E.coli</i>	<i>ylil</i>	Aldose-DH	periplasmatisch	1116	-	38,8	PQQ
<i>A. pasteurianus</i>	<i>ap_9346</i>	putat. Glukose-DH	membranständig	2500	5	88	PQQ
	<i>ap_0272</i>	putat. Sorboson-DH	periplasmatisch	830	-	45,8	PQQ
	<i>ap_9076</i>	putat. Glukose-DH	membranständig	2500	5	86,9	PQQ
	<i>ap_0092</i>	putat. Sorboson-DH	periplasmatisch	1400	-	45,6	PQQ

## **3.2 Produktion und Charakterisierung von neuartigen löslichen Dehydrogenasen**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf die Charakterisierung löslicher Oxidoreduktasen gelegt. Im Gegensatz zu membrangebundenen Enzymen sind diese leicht zugänglich, sodass aufwendige Solubilisierungsschritte der Proteine aus der Cytoplasmamembran entfallen. Das verschafft dieser Art von Enzymen einen Vorteil in Hinblick auf mögliche biotechnologische Anwendungsgebiete. Die Gene der mittels Blastp-Analysen ausgewählten löslichen Oxidoreduktasen (Tab. 5) sollten im Folgenden amplifiziert und Expressionsplasmide erstellt werden, die eine heterologe Produktion der Proteine in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* ermöglichen.

### **3.2.1 Erstellung von Expressionsplasmiden**

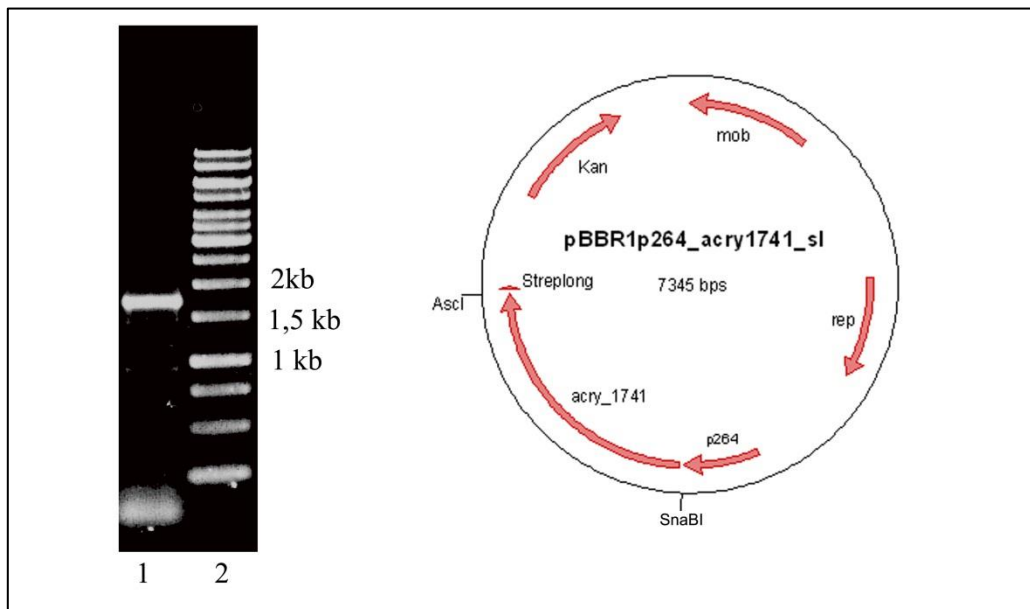
Die Vektoren, die für die Expression der ausgewählten Dehydrogenasen erstellt wurden, basieren auf den von Kallnik *et al.* entwickelten Plasmiden pBBRp264\_St und pBBRp452\_St (Kallnik *et al.*, 2010). Die Plasmide verfügen über konstitutiv exprimierte Promotoren von Genen, die für die ribosomalen Proteine Gox0264 und Gox0452 kodieren. Diese Promotoren wurden aus *G. oxydans* 621H amplifiziert und in die genannten Plasmide eingefügt. Expressionsstudien zeigten, dass sich diese Plasmide für die Proteinproduktion in *G. oxydans* 621H eignen. Die verwendeten Promotoren unterschieden sich in ihrer Expressionsstärke. Der Promotor *p264* weist eine starke und der Promotor *p452* eine moderate Transkriptionsrate auf (Kallnik *et al.*, 2010). Für die löslichen Dehydrogenasen wurde der Vektor mit dem starken Promotor *p264* verwendet. Einige der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wiesen eine zusätzliche Modifikation auf. So wurde der Strep-Tag II der Plasmide durch einen sogenannten Streplong (Sl) ausgetauscht. Der Streplong besteht aus derselben Aminosäuresequenz wie der Strep-Tag II (WSHPQTEK), ist jedoch über eine aus sieben Aminosäuren bestehenden Linkersequenz (APGGGSA) an das Protein fusioniert. Studien deuten darauf hin, dass der verlängerte Strep-Taq (Streplong) nach der Faltung des Proteins in dessen Tertiärstruktur besser zugänglich ist und dadurch eine effizientere Aufreinigung ermöglicht (Zeiser *et al.*, 2014; Zeiser, 2015). Für die, in dieser Arbeit klonierten Plasmide, wurden die Schnittstellen *SnaBI/EcoRV/DraI* und *AscI* verwendet.

#### **3.2.1.1 Erstellung von Plasmiden für die Expression löslicher Oxidoreduktasen**

Die Gene der cytoplasmatischen und periplasmatischen PQQ- oder Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen (Tab. 5) wurden von der genomischen DNA der Organismen amplifiziert und mit ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten. Beispielhaft ist hier die Klonierung des Gens *acry1741*, das für eine putative Alkohol-Dehydrogenase aus *A. cryptum* JF-5



kodiert, dargestellt. Das Gen wurde mithilfe der Primer *acryCF5\_1741\_fw* und *acry1741\_rev2* mitsamt des nativen Signalpeptids amplifiziert und die erhaltene DNA-Bande mit einer erwarteten Größe von 1,7 kb mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt (Abb. 1). Anschließend wurden das Insert (*acry1741*) und der Vektor (pBBR1p264\_Sl) mit den Restriktionsenzymen *SnaBI* und *AscI* geschnitten. Der Vektor wurde zusätzlich mit alkalischer Phosphatase inkubiert, um die Religationsrate zu minimieren. Nach erfolgter Ligation wurde das Plasmid pBBRp264\_acry1741\_SL (Abb. 1) in *E. coli* NEB 5 alpha transformiert, vervielfältigt und aufgereinigt.



**Abbildung 1:** Elektrophoretische Auftrennung des amplifizierten Gens *acry1741* und Konstruktion des Expressionsplasmids pBBR1p264\_acry1741\_sl. Links: 1: PCR zur Amplifizierung des Gens *acry1741* mit der erwarteten Größe von 1,7 kb; 2: 1kb-Marker (Thermo Scientific). Rechts: Erstelltes Expressionsplasmid pBBR1p264-acry1741\_sl mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen *SnaBI* und *AscI*; Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion; Streplong: mit Linkerregion verlängerter Strep-Tag II

Das Plasmid wurde sequenziert und anschließend mittels Elektroporation in den Expressionsstamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* eingebracht. Nach gleichem Schema wurden die Gene *swit1001*, *swit2227*, *swit1323*, *swit4160* und *acry2797* kloniert und in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* übertragen. Die entsprechenden Primer für die Amplifizierung und die gewählten Restriktionsenzyme für die Klonierung sind in Tabelle 2 dargestellt (Vgl. Kap. 2.2.3.2).

### 3.2.2 Produktion von löslichen Oxidoreduktasen

Für die Produktion der löslichen Dehydrogenasen wurden *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR*-Kulturen, die das jeweilige Plasmid enthielten (Tab. 6) in 500 ml YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von

0,8 – 1,2 kultiviert und geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Anschließend wurden die jeweiligen Proteine über den C-terminal fusionierten Streplong mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Proteinkonzentration der erhaltenen Elutionsfraktionen wurde mit Hilfe des Bradford Reagenz bestimmt. Von den 11 in Tabelle 6 aufgelisteten Proteinen konnten zwei Dehydrogenasen erfolgreich produziert werden. Zum einen die cytoplasmatische Oxidoreduktase Gox1630 aus *G. oxydans* 621H sowie die putative Polyvinylalkohol-Dehydrogenase Swit1323 aus *S. wittichii* RW1.

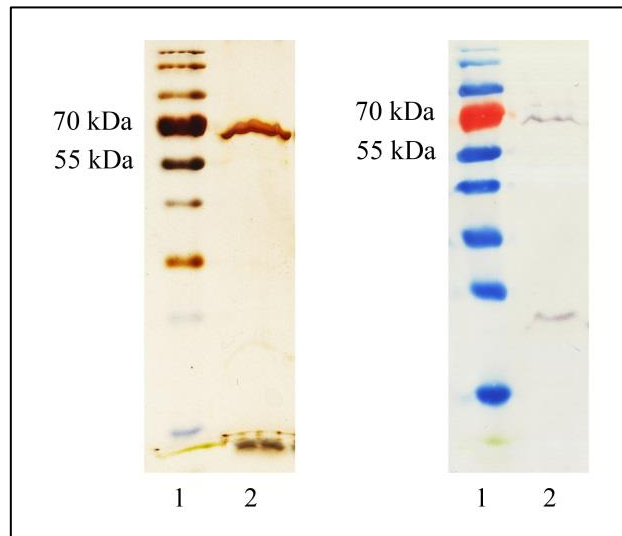
**Tabelle 6:** Auflistung der löslichen Dehydrogenasen (DH), die zur Produktion in *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR* ausgewählt wurden

Organismus	Gen	Annotation	Lokalisierung	Promotor
<i>G. oxydans</i>	<i>gox_1630</i>	Oxidoreduktase	cytoplasmatisch	p264
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_0721</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	p264
	<i>swit_1001</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	p264
	<i>swit_1054</i>	putat. Glukose-DH	periplasmatisch	p264
	<i>swit_2227</i>	putat. Ethanol-DH Typ1	periplasmatisch	p264
	<i>swit_1323</i>	putat. Pva-DH	periplasmatisch	p264
	<i>swit_1441</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	p264
	<i>swit_4160</i>	PQQ-abhäng. Protein	periplasmatisch	p264
<i>A. cryptum</i>	<i>acry_2797</i>	PQQ-abhäng. DH	periplasmatisch	p264
	<i>acry_1741</i>	putat. Alkohol-DH	periplasmatisch	p264
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_1529</i>	putat. Sorbose-DH	periplasmatisch	p264

### 3.2.2.1 Produktion der löslichen Flavin-abhängigen Oxidoreduktase Gox1630

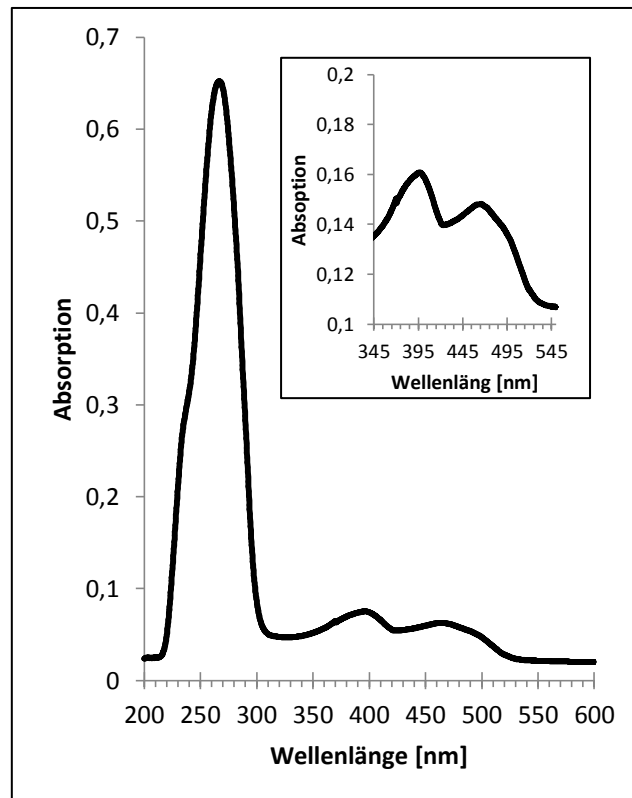
Das Plasmid pBBR1p264-*gox1630*-St wurde mittels Elektroporation in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* eingebracht und die Produktion der cytoplasmatischen Oxidoreduktase Gox1630 erwies sich mit einer aufgereinigten Proteinmenge von 1,1 mg Protein aus 500 ml Kultur als erfolgreich. Bioinformatische Analysen des Proteins Gox1630 ließen ein Molekulargewicht von 35 kDa erwarten, was jedoch nicht der mittels Silberfärbung und Western Blot detektierten Proteingröße entsprach (Abb. 2). Die abweichende bioinformatische Berechnung des Molekulargewichtes basierte auf einer fehlerhaften Annotation des Gens *gox1630*, dessen Startcodon 564 bp stromaufwärts des annotierten Genstarts liegt (persönliche Mitteilung Dipl. Biologin Ina Berthold und Dr. Paul Schweiger, Universität Bonn). Eine Neuberechnung der Proteingröße ergab eine Proteingröße von 59 kDa. In der elektrophoretischen Analyse mittels SDS-Page und im Western Blot konnte eine Proteinbande mit der Größe von 60,3 kDa detektiert werden, was dem bioinformatisch berechneten Molekulargewicht von Gox1630

entsprach (Abb. 2). Bei der schwachen Proteinbande von 24 kDa handelt es sich um ein Biotin-bindendes Protein. *G. oxydans* 621H besitzt, wie die meisten  $\alpha$ -Proteobakterien, Gene zur Biosynthese von Biotin sowie Enzyme, die Biotin als prosthetische Gruppe binden (Rodionov und Gelfand, 2006; Dakshinamurti und Chauhan, 1994).



**Abbildung 2:** Silberfärbung und Western Blot der cytoplasmatischen Oxidoreduktase Gox1630 produziert in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR. Links: Silberfärbung. Rechts: Western Blot. 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aufgereinigte Oxidoreduktase Gox1630.

Proteine mit Biotin-Bindedomänen können eine Affinität zur Streptactin-Matrix der Chromatographiesäule aufweisen und so als Kontamination mit dem Protein von Interesse co-isoliert werden. Die bioinformatische Analyse des Proteins Gox1630 lies auf das Vorhandensein von FAD als prosthetische Gruppe schließen. Daher wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen, um das Vorhandensein von FAD zu überprüfen. Das Spektrum zeigte, neben dem Proteinpeak bei 280 nm, zwei deutliche Peaks bei den Wellenlängen 397 nm und 465 nm (Abb. 3). Hierbei handelt es sich um die für FAD typischen Absorptionspeaks, die im Bereich von 370 nm und 450 nm liegen (Massey und Ganther, 1965). Die Sichtbarkeit der FAD-charakteristischen Peaks im Absorptionsspektrum des Proteins zeigte, dass sich das Protein zum Zeitpunkt der Isolierung in einem oxidierten Zustand befand (Ghisla *et al.*, 1974; Massey und Ganther, 1965). Über die Absorption des FAD und dessen Extinktionskoeffizient konnte die Menge an FAD pro Protein bestimmt werden. Es ergab sich ein Verhältnis von FAD:Protein von 2:1. Die Aminosäuresequenz wies zwar lediglich eine eindeutige FAD-Bindedomäne im Bereich der Aminosäuren 100 - 290 auf, jedoch konnte in der Proteinsequenz von Gox1630 ein zweiter zum FAD-Bindemotiv homologer Bereich identifiziert werden, der die Aminosäuren 481-533 umfasst.



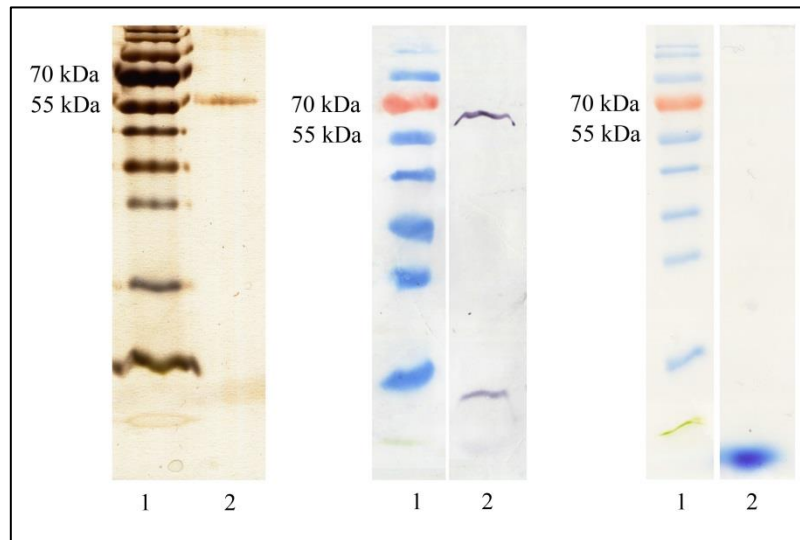
**Abbildung 3:** UV-VIS-Spektrum der aufgereinigten Oxidoreduktase Gox1630. Das Spektrum wurde in 40 mM KPb bei einem pH-Wert von 7 aufgenommen. Die Enzymkonzentration betrug 430  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Zu sehen sind der Proteinpeak bei 280 nm sowie zwei FAD-charakteristische Peaks bei 397 nm und 465 nm.

Anschließend Enzymaktivitätstests wurden in KPb-Puffer bei pH 7 durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren bzw.-donatoren wurden NAD(P)/NAD(P)H, Hexacyanoferrat (III) und DCPIP/PMS verwendet und als Substrate wurden Alkohole, Zucker, Aldehyde, Diole, Ketone und Aminosäuren eingesetzt (s. Anhang 1). Die Oxidoreduktase Gox1630 konnte keines der unter diesen Bedingungen getesteten Substrate umsetzen, was auf eine hohe Substratspezifität des Enzyms hindeutet. Eine Beteiligung der Oxidoreduktase an der Umsetzung von Intermediaten während der Biosynthese von Zellbestandteilen wäre denkbar.

### 3.2.2.2 Expression der periplasmatischen Dehydrogenase Swit1323

Die putative Polyvinylalkohol-Dehydrogenase Swit1323 aus *S. wittichii* RW1 konnte ebenfalls erfolgreich im Stamm *G. oxydans* 621H $\Delta$ hsdR produziert werden. Die erzielte Proteinmenge betrug 0,55 mg Protein aus 500 ml Kultur. Das Protein konnte elektrophoretisch als Bande mit einer Größe von 63 kDa nachgewiesen werden und sowohl mittels Silberfärbung, als auch mittels Western Blot detektiert werden (Abb. 4). Bei der periplasmatischen Dehydrogenase Swit1323 handelt es sich um ein Chinohämprotein, das sowohl PQQ als auch Häm *c* als prosthetische Gruppe trägt. Zum Nachweis des Häm *c* wurde

eine Hämefärbung durchgeführt, jedoch konnte keine Bande mit der erwarteten Größe von 66 kDa detektiert werden (Abb. 4). Sowohl Häm *c* als auch PQQ sind als prosthetische Gruppen essentiell für die Funktionalität der Dehydrogenase und ein inkorrekt oder fehlender Einbau dieser in das Enzym, kann zu dessen Inaktivierung führen.



**Abbildung 4:** Elektrophoretischer und Western Blot der PQQ-abhängigen Dehydrogenase Swit1323. Links: Silberfärbung. Mitte: Western Blot. Rechts: Hämefärbung. 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aus *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* aufgereinigtes Protein Swit1323 mit einer Größe von 63 kDa.

Beide prosthetischen Gruppen werden *in vivo* unter Beteiligung weiterer Proteine im Periplasma in das Apoprotein eingefügt (Morris *et al.*, 1994; Arslan *et al.*, 1998; Mavridou *et al.*, 2013). Im Falle des PQQ kann ein künstliches Einfügen der prosthetischen Gruppe in das Enzym *in vitro* erfolgen. Diesen Vorgang der Bindung der prosthetischen Gruppe PQQ an das Apoenzym *in vitro* wird Rekonstitution genannt. Damit die Bindung des PQQ an das Protein erfolgen kann, ist eine hohe Konzentration eines bivalenten Ion, meist  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ , notwendig (Keltjens *et al.*, 2014).  $\text{Ca}^{2+}$  ist essentiell für die Struktur des Proteins und hält das PQQ in seiner aktiven Konformation (Anthony, 2001). Enzymaktivitätstests wurden mit dem aufgereinigten Protein Swit1323 sowie mit dem Protein nach erfolgter Rekonstitution durchgeführt. Als Elektronenakzeptor wurde DCPIP/PMS verwendet. Als Substrate wurden Alkohole, Zucker, Dirole, Aldehyde und Aminosäuren eingesetzt (s. Anhang 1). Das Enzym zeigte mit keinem der verwendeten Substrate eine Aktivität. Ein Grund für die Inaktivität des Enzyms könnte der nicht erfolgte Einbau der prosthetischen Gruppen sein.

### 3.2.3 Expressionsstudien und Sequenzanalysen

Lediglich zwei der 11 uncharakterisierten löslichen Dehydrogenasen konnten im Rahmen dieser Arbeit in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produziert und aufgereinigt werden (Tab. 6). Hierbei

handelte es sich um die FAD-abhängige Oxidoreduktase Gox1630 sowie um die putative Polyvinyl-Alkohol-Dehydrogenase Swit1323, die über PQQ und Häm *c* als prosthetische Gruppen verfügen sollte. Beide Enzyme konnten aufgereinigt werden, zeigten bei darauffolgenden Enzymaktivitätstests jedoch keine Aktivität. Um zu überprüfen, ob die ausbleibende Proteinproduktion der übrigen neun periplasmatischen Dehydrogenasen (Tab. 6) durch Probleme auf der Expressionsebene verursacht wurde, sollte im nächsten Schritt mittels RT-qPCR-Analyse exemplarisch die Transkription der Gene überprüft werden, die für die nicht produzierbaren Dehydrogenasen kodieren. Bei allen Plasmiden, die für die Expression löslicher Dehydrogenasen verwendet wurden, handelte es sich um Derivate des Plasmids pBBR1p264\_Sl, sodass die Plasmide die gleiche Promotorstruktur und das gleiche Expressionsverhalten aufwiesen. Beispielhaft wurde deswegen die Expression des Gens *swit1054*, das auf dem Plasmid pBBR1p264-swit1054-sl kodiert lag, mittels RT-qPCR untersucht. Als Referenzgen wurde *gox0508* ausgewählt, welches für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert und konstitutiv in einer moderaten Stärke in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* exprimiert wird (Meyer *et al.*, 2013). Aus einer 200 ml-Kultur des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* *swit1054*, der das Plasmid pBBR1p264-swit1054-Sl besaß, wurde RNA extrahiert und diese in einer RT-qPCR-Analyse eingesetzt. Durch den Vergleich der Expressionsstärken von *swit1054* und *gox0508* konnte die Transkriptionsabundanz von *swit1054* bestimmt werden. Dafür wurde vom Referenzgen und dem Gen von Interesse der Ct-Wert ermittelt, der für die Quantifizierung der RNA genutzt wurde und den Zyklus der RT-qPCR beschreibt, bei dem erstmals ein signifikanter Fluoreszenzunterschied zwischen Hintergrundfluoreszenz und Amplifizierungsfluoreszenz detektiert wurde. Durch die Berechnung des  $\Delta$ Ct-Wertes, die Differenz der Ct-Werte von Referenz und Zielgen, konnte dann ein quantitativer Vergleich der RNA-Mengen durchgeführt werden. Der für *swit1054* ermittelte Ct-Wert lag bei  $29,8 \pm 0,3$  und der Ct-Wert, der für das Referenzgen *gox0508* bestimmt wurde, betrug  $29,5 \pm 0,9$ . Somit ergab sich ein  $\Delta$ Ct-Wert von  $-0,24$ . Der so ermittelte  $\Delta$ Ct-Wert zeigte, dass *swit1054* um ein 0,2-faches geringer exprimiert wurde als *gox0508*. Da *gox0508* eine moderate Transkriptionsrate aufweist, war basierend auf den RT-qPCR-Ergebnissen davon auszugehen, dass das Gen *swit1054* schwach exprimiert wurde. Da *swit1054* im Expressionsplasmid unter der Kontrolle des starken *p264*-Promotors stand, wäre eine höhere Transkriptionsrate des Gens *swit1054* verglichen mit dem Referenzgen *gox0508* zu erwarten gewesen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine generelle Transkription des Gens *swit1054* erfolgte, sodass der Grund für die ausbleibende Proteinproduktion nicht auf Transkriptionsebene lag.

Obwohl eine Transkription des Gens *swit1054* stattfand, kam es im Rahmen dieser Arbeit zu keiner Proteinproduktion. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Basierend auf einer schnellen Degradierung der mRNA, könnten Störungen in der Translation der mRNA verursacht werden. Die Beschaffenheit des 5'-Endes der mRNA beeinflusst dabei maßgeblich sowohl die Translationseffizienz, als auch die Halbwertszeit der mRNA. Die Stabilität der mRNA basiert vornehmlich auf die Ausbildung von sekundären RNA-Strukturen, wie Schleifen, Kleeblatt- oder Haarnadel-Strukturen. Sind solche Strukturen nicht vorhanden, kann dies die Halbwertszeit der mRNA in der Zelle herabsetzen und die Proteinproduktion inhibieren (Baneyx, 1999; Sørensen und Mortensen, 2005; Goodman *et al.*, 2013; Pop *et al.*, 2014). Translationsprobleme können zudem auftreten, wenn Organismen starke Unterschiede in der Verwendung bzw. in der Präferenz von bestimmten Codons zeigen. Treten viele Codons in einer zu translatierenden Gensequenz auf, die selten vom Expressionsstamm genutzt werden, kann es zu Translationsproblemen, oder zum Translationsabbruch kommen, da der Organismus die tRNAs für diese Codons nur geringfügig synthetisiert. Zu diesem Zweck wurde der Codon-Gebrauch (Codon usage) von *G. oxydans* mit dem Codon-Gebrauch der Organismen, aus denen die, für die zu produzierenden Dehydrogenasen kodierenden, Gene stammten, verglichen. Da keine ausschlaggebenden Unterschiede im Codon-Gebrauch festgestellt werden konnten, wurden die periplasmatischen Enzyme zusätzlich in Bezug auf die N-end-Regel analysiert. Die N-end-Regel besagt, dass die Halbwertszeit eines Proteins in der Zelle stark von den N-terminalen Aminosäureresten abhängt. So gelten beispielsweise in *E. coli* die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Tryptophan, Tyrosin, Arginin und Lysin als destabilisierende Aminosäuren (Varshavsky, 1996; Byrd *et al.*, 1998). Treten diese am N-Terminus des Proteins auf, wird dieses Protein schneller vom proteolytischen System der Zelle abgebaut, als Proteine mit stabilisierenden N-terminalen Aminosäuren. Da für *G. oxydans* keine destabilisierenden Aminosäuren beschrieben waren, wurden die N-Termini der Aminosäuresequenzen der periplasmatischen Dehydrogenasen nach Entfernung des Signalpeptids auf Aminosäuren untersucht, die für *E. coli* als destabilisierend gelten. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, beginnt keine der Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Dehydrogenasen mit einer destabilisierenden Aminosäure. Ein erhöhtes Degradationsrisiko der Enzyme aufgrund der N-Ende-Regel konnte somit ausgeschlossen werden. Ein weiterer Grund für eine ausbleibende Proteinproduktion könnte eine inkorrekte Lokalisierung der Dehydrogenasen sein. Eine darauf basierende Fehlfaltung der Proteine könnte dann ebenfalls zur Degradierung selbiger führen.

**Tabelle 7:** Analyse der Aminosäuresequenz der periplasmatischen Dehydrogenasen

<b>Organismus</b>	<b>Gen</b>	<b>Annotation</b>	<b>Start-Aminosäure</b>
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_0721</i>	putat. Alkohol Dehydrogenase	Alanin
	<i>swit_1001</i>	putat. Alkohol Dehydrogenase	Alanin
	<i>swit_1054</i>	putat. Glukose Dehydrogenase	Alanin
	<i>swit_2227</i>	putat. Ethanol Dehydrogenase Typ1	Glycin
	<i>swit_1323</i>	putat. Pva Dehydrogenase	Glutamin
	<i>swit_1441</i>	putat. Alkohol Dehydrogenase	Serin
	<i>swit_4160</i>	PQQ-abhäng. Protein	Glycin
<i>A. cryptum</i>	<i>acry_2797</i>	PQQ-abhäng. Protein	Glycin
	<i>acry_1741</i>	putat. Alkohol-Dehydrogenase	Glutamin
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_1529</i>	putat. Sorbose Dehydrogenase	Leucin
<i>E. coli</i>	<i>ylil</i>	Aldose Dehydrogenase	Alanin

Des Weiteren können Abweichungen in der Proteinstruktur Organismus-fremder Proteine von der Proteinstruktur nativer Dehydrogenasen zu Problemen bei deren Synthese und korrekter Faltung im Expressionsstamm führen (Baneyx, 1999; Georgiou und Valax, 1996; Tommassen *et al.*, 1985).

### **3.2.4 Expression cytoplasmatischer und periplasmatischer Dehydrogenasen in *G. oxydans* BP.9**

In einem weiteren Ansatz wurde ein alternativer Expressionsstamm gewählt, um die Ausbeute der zu produzierenden Dehydrogenasen zu erhöhen. Dazu wurde die *G. oxydans*-Deletionsmutante BP.9 ausgewählt, bei der alle membrangebundenen Dehydrogenasen, außer der Lactat-Dehydrogenase, deletiert wurden (Peters *et al.*, 2013). Da die membrangebundenen Dehydrogenasen einen großen Anteil am Proteom von *G. oxydans* ausmachen, könnte die ausbleibende Produktion dieser Enzyme, basierend auf der Deletion der korrespondierenden Gene, zu einer Entlastung des Proteinbiosynthesystems führen. Durch diese Entlastung bestand die Möglichkeit, dass die Mutante BP.9 sich als besser für Expressionsversuche erweisen würde, als der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*. Die Plasmide, welche für die löslichen Dehydrogenasen kodierenden Gene enthielten, wurden in die Deletionsmutante *G. oxydans* BP.9 eingebracht und es wurden Versuche zur Proteinproduktion durchgeführt. Die Kulturen wurden in 500 ml YF-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1,2 angezogen und dann mittels Ultraschall lysiert.



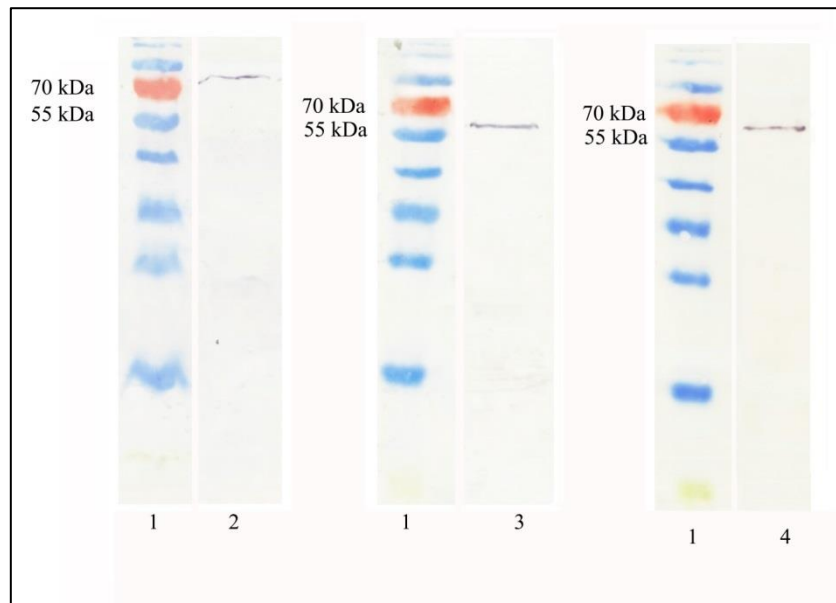
**Tabelle 8:** Zur Produktion in *G. oxydans* BP.9 ausgewählte, lösliche Oxidoreduktasen

<b>Organismus</b>	<b>Gen</b>	<b>Annotation</b>	<b>Promotor</b>	<b>Produktion</b>
<i>G. oxydans</i>	<i>gox_1630</i>	Oxidoreduktase	p264	ja
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_0721</i>	putat. Alkohol Dehydrogenase	p264	ja
	<i>swit_1001</i>	putat. Alkohol Dehydrogenase	p264	-
	<i>swit_1054</i>	putat. Glukose Dehydrogenase	p264	-
	<i>swit_2227</i>	putat. Ethanol Dehydrogenase typ1	p264	-
	<i>swit_1323</i>	putat. Pva Dehydrogenase	p264	-
	<i>swit_1441</i>	putat. Alkohol Dehydrogenase	p264	-
	<i>swit_4160</i>	PQQ-abhäng. Protein	p264	-
<i>A. cryptum</i>	<i>acry_2797</i>	PQQ-abhäng. Protein	p264	ja
	<i>acry_1741</i>	putat. Alkohol-Dehydrogenase	p264	ja
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_1529</i>	putat. Sorbose Dehydrogenase	p452	-

Die Proteinaufreinigung erfolgte wie zuvor über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Von den 11 uncharakterisierten Enzymen konnten vier erfolgreich in der Mutante *G. oxydans* BP-9 produziert werden (Tab. 8). Unter den produzierten Enzymen befand sich die Oxidoreduktase Gox1630, die zuvor bereits aus dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* isoliert worden ist (Vgl. Kap. 3.2.3.1) und auch nach Produktion und Aufreinigung aus der *G. oxydans* BP.9-Mutante keine Aktivität zeigte. Neben Gox1630 konnten die putative Alkohol-Dehydrogenase Swit0721 aus *S. wittichii* RW1, sowie die putative Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 und eine weitere PQQ-abhängige Dehydrogenase, Acry2797, aus *A. cryptum* JF-5 in der BP.9-Mutante produziert und aufgereinigt werden. Die erhaltenen Proteinmengen betragen pro 500 ml Kultur 0,12 mg (Acry2797), 0,1 mg (Swit0721) und 0,41 mg (Acry1741). Über ein spezifisches Streptactin-Konjugat konnten Proteinbanden mit Größen von 74,7 kDa (Swit0721), 59,2 kDa (Acry2797) und 61,7 kDa (Acry1741) nach elektrophoretischer Auftrennung im Western Blot detektiert werden (Abb. 5). Für Swit0721 entsprach die detektierte Bande der berechneten Proteingröße von 72,7 kDa. Die detektierten Proteinbanden der beiden Dehydrogenasen aus *A. cryptum* JF-5 lagen mit 59,2 kDa (Acry2797) und 61,7 kDa (Acry1741) geringfügig über den berechneten Molekulargewichten von 52,1 kDa (Acry2797) und 58,7 kDa (Acry1741). Die darauffolgenden Enzymtests wurden wie zuvor beschrieben mit DCPIP/PMS als Elektronenakzeptoren in 40 mM KPB, pH 7 durchgeführt. Als Substrate wurden Aldehyde, Alkohole, Zucker, Diole und Aminosäuren getestet (s. Anhang 1). Mit keinem der Substrate konnte eine Aktivität gemessen werden.

Um auszuschließen, dass die Inaktivität der Proteine auf eine nicht korrekte oder nicht erfolgte Integration der prosthetischen Gruppe PQQ ins Enzym zurückzuführen war, wurde

eine Rekonstitution der Proteine vor Beginn der enzymatischen Tests durchgeführt. Auch nach erfolgter Rekonstitution der Proteine mit PQQ konnte keine Enzymaktivität detektiert werden.



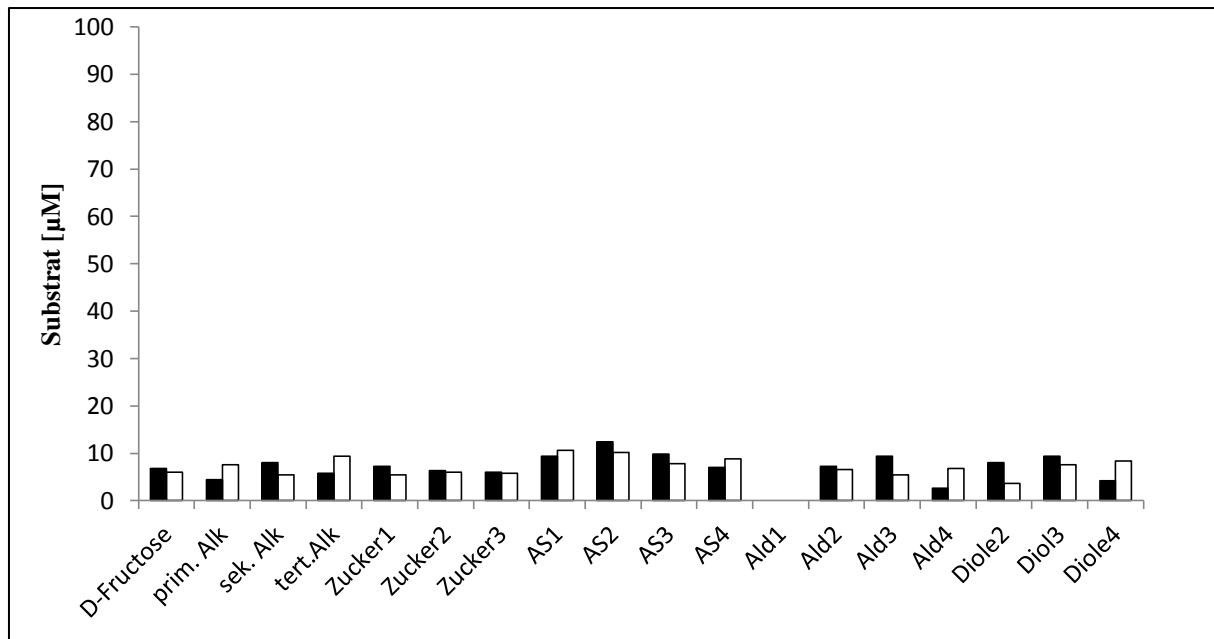
**Abbildung 5:** Western Blot der Proteine Swit0721, Acry1741 und Acry2797 heterolog produziert in *G. oxydans* BP.9. 1: Prestained Protein Ladder (Therma Scientific). 2: Aufgereinigtes Protein Swit0721. 3: Aufgereinigtes Protein Acry2797. 4: Aufgereinigtes Protein Acry1741

Um potentielle Gründe für die Inaktivität der Dehydrogenasen zu erschließen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Daher wird in den folgenden Kapiteln die Substratumsetzung an ganzen Zellen sowie die Produktion eines Modellproteins in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* beschrieben. Auf diese Weise sollte zum einen ein Hinweis auf die Funktion der periplasmatischen Dehydrogenasen basierend auf möglichen Unterschieden in der Substratumsetzung der Zellen erhalten werden. Zum anderen sollte gezeigt werden, dass eine periplasmatische Dehydrogenase mit bekanntem Substratspektrum als Modellprotein aktiv in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produziert werden kann. Somit sollte untersucht werden, ob die Inaktivität der übrigen Dehydrogenasen auf der Wahl nicht geeigneter Substrate basierte oder anderweitig begründet war, wie beispielsweise durch eine inkorrekte Faltung der Proteine.

### 3.2.5 Substratumsetzung an ganzen Zellen

Im nächsten Schritt wurden Enzymaktivitätstests an ganzen Zellen durchgeführt. Der Vorteil bei der Verwendung ganzer Zellen ist die Gewährleistung der nativen Umgebung der zu charakterisierenden Enzyme, sodass die optimalen physiologischen Bedingungen, die Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms haben könnten, gegeben sind. Auf diese Weise sollte

ermittelt werden, ob der Prozess der Proteinaufreinigung in Zusammenhang mit der Inaktivität der Proteine stand.



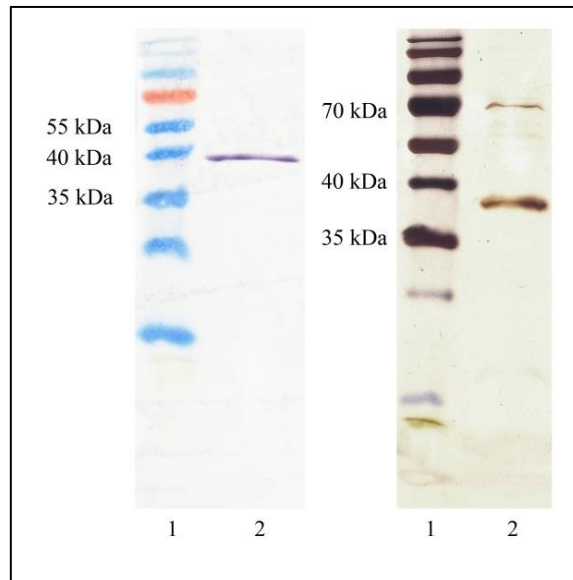
**Abbildung 6:** Enzymaktivitätstest mit ganzen Zellen. Gemessen wurde die Umsetzung verschiedener Substrate aus unterschiedlichen Substratklassen von ganzen Zellen der *G. oxydans* BP.9-Mutante (schwarze Balken) und der Mutante *G. oxydans* BP.9 *acry1741*, die das für eine putative Alkohol-Dehydrogenase kodierende Gen *acry1741* besaß (weiße Balken). Die Substratumsetzung wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) und 1 mM Hexacyanoferrat(III) wurde als Elektronenakzeptor verwendet. Die Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt ist die Substratkonzentration, die nach 30-minütiger Inkubation durch die Zellen umgesetzt worden ist. Alk: Alkohole, AS: Aminosäuren, Ald: Aldehyde. Die Daten zeigen ein von drei Experimenten.

Im nachfolgenden Beispiel sind die Enzymaktivitätstests stellvertretend an ganzen Zellen der BP.9-Mutante im Vergleich zum Stamm *G. oxydans* BP.9 *acry1741*, der das für die putative Alkohol-Dehydrogenase *Acry1741* kodierende Gen auf einem Plasmid trug, dargestellt (Abb. 6). Die Kulturen wurden in YM-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 1-1,2 kultiviert und nach zweimaligen Waschen mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) in selbigem Puffer resuspendiert. Als Elektronenakzeptor wurde Hexacyanoferrat(III) genutzt und als Substrate wurden Substratpakete verschiedener Stoffklassen, wie Alkohole, Diole, Aldehyde, Zucker und Aminosäuren eingesetzt (s. Anhang 2). Die Zellen, der Elektronenakzeptor und das Substrat wurden in einer 96-Wellplatte zusammengegeben und dann die Extinktionsabnahme des Hexacyanoferrat(III) bei 420 nm verfolgt. Über die Extinktionsabnahme des Elektronenakzeptors Hexacyanoferrat(III) konnte die Substratkonzentration berechnet werden, die von den Zellen umgesetzt worden ist. In Abbildung 6 ist die Konzentration der jeweiligen Substrate dargestellt, die nach 30-minütiger Inkubation von den Zellen umgesetzt worden ist. Wäre eine der Substratgruppen durch die Mutante *G. oxydans* BP.9 *acry1741* schneller

umgesetzt worden als durch die BP.9-Mutante ohne zusätzliches Plasmid, hätte dies einen Hinweis auf das Substratspektrum der putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 geben können. Es konnten jedoch weder nach 30-minütiger, noch nach einstündiger, sechsständiger, oder 23-stündiger Inkubation, signifikante Unterschiede im Umsatz der Substrate durch die zwei Stämme beobachtet werden. Ebenso verhielt es sich bei den Versuchen an ganzen Zellen mit den BP.9-Mutanten, welche die in Tabelle 8 aufgeführten, für weitere lösliche Oxido-reduktasen kodierenden Gene als Expressionsplasmid trugen und keine Unterschiede im Substratumsatz verglichen mit der BP.9-Mutante aufzeigten.

### **3.2.6 Produktion des Modellproteins YliI aus *E. coli***

Wie zuvor dargestellt wurde, war die Produktion periplasmatischer Proteine mit *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* als Expressionsstamm möglich, jedoch zeigten die produzierten Dehydrogenasen keine Aktivität. Da es sich bei den produzierten Dehydrogenasen um nicht charakterisierte Proteine handelte und die Substrate der Enzyme nicht bekannt waren, erwies sich eine Differenzierung, zwischen einer Inaktivität der Proteine aufgrund der inkorrekten Faltung und einer Inaktivität der Proteine basierend auf die Wahl von nicht geeigneten Substraten, als schwierig. Im folgenden Teil der Arbeit wurde daher die PQQ-abhängige Aldose-Dehydrogenase YliI aus *E. coli* DH5 $\alpha$  in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* eingebracht und exprimiert. YliI eignet sich als Modellprotein, da es sich um eine bereits charakterisiert periplasmatische Dehydrogenase handelt, die PQQ als prosthetische Gruppe trägt und eine Vielzahl an Aldosen zu den korrespondierenden Zuckersäuren umsetzt (Southall *et al.*, 2006). Anhand des ausgewählten Modellproteins sollte die Inaktivität der anderen Dehydrogenasen genauer analysiert werden. Das Gen wurde amplifiziert und in den Vektor pBBR1p264\_S1 kloniert. Das Plasmid wurde in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* eingebracht und eine Proteinproduktion mit anschließender chromatographischer Proteinaufreinigung über das C-terminal fusionierte Streplong durchgeführt. Die eluierte Proteinmenge betrug 0,1 mg Protein aus 500 ml Kultur. Die elektrophoretische Analyse und der Western Blot des Proteins zeigten eine Bande der erwarteten Größe von 38,8 kDa (Abb. 7). Für die anschließenden Enzymaktivitätstests wurden DCPIP/PMS als Elektronenakzeptor verwendet. Als Substrate wurden Glukose, Maltose, Lyxose und Galaktose eingesetzt. Bei keinem der getesteten Substrate konnte eine Aktivität des Enzyms gemessen werden.



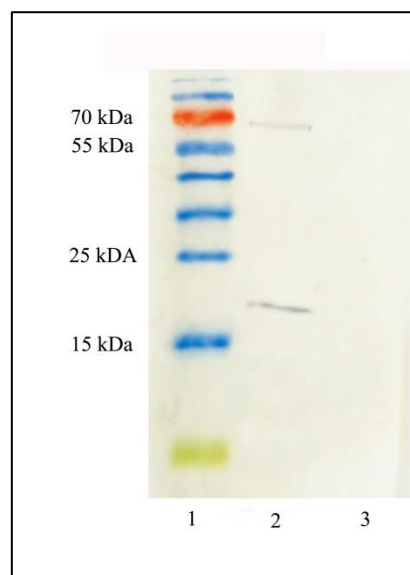
**Abbildung 7:** Western Blot und Silberfärbung der in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produzierten Aldose-Dehydrogenase YliI. Links: Western Blot des aufgereinigten Proteins YliI. Rechts SDS-PAGE und Silberfärbung der aufgereinigten Aldose-Dehydrogenase YliI. 1 Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aufgereinigtes Protein YliI.

Da eine Charakterisierung des Enzyms YliI bereits erfolgt ist und das Substratspektrum der Dehydrogenase beschrieben wurde (Southall *et al.*, 2006), muss die in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produzierte Aldose-Dehydrogenase inaktiv in der Zelle vorliegen. In weiteren Experimenten sollte ermittelt werden worauf die Inaktivität des Proteins basierte.

### 3.2.7 Protein-Lokalisierung

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, lag das produzierte Modellprotein YliI nach erfolgter Aufreinigung in *G. oxydans* 621H  $\Delta$  *hsdR* inaktiv vor. Somit ist davon auszugehen, dass der Grund für die Inaktivität des Enzyms der gleiche ist, wie für die Inaktivität der in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* und *G. oxydans* BP.9 produzierten periplasmatischen Dehydrogenasen (Tab. 8). Da ein häufig auftretender Grund für die Inaktivität heterolog produzierter Proteine eine inkorrekte Proteinfaltung ist, die oftmals auf eine nicht erfolgte Translokation des Proteins basiert, sollte zunächst die Lokalisierung der inaktiven periplasmatischen Dehydrogenasen in *G. oxydans* ermittelt werden. Alle periplasmatischen Dehydrogenasen, die im Zuge dieser Arbeit analysiert werden sollten, besitzen ein Signalpeptid für den Sec-abhängigen Transport über die cytoplasmatische Membran. Beim Proteintransport über das Sec-Translokationssystem werden Proteine ungefoldet ins Periplasma transportiert. Im Periplasma erfolgen die Faltung des Proteins sowie der Einbau jeweiliger prosthetischer Gruppen. Eine Erklärung für die Inaktivität der exprimierten Dehydrogenasen könnte ein Problem bei der Translokalisierung der Proteine ins Periplasma sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem ersten Schritt, stellvertretend für die anderen periplasmatischen Dehydrogenasen (Tab. 8), die Lokalisierung der putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 überprüft. Hierfür wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt, bei der cytoplasmatische und periplasmatische Fraktionen der Zelle voneinander getrennt wurden. Die cytoplasmatische Fraktion ist dabei gleichzusetzen mit lysierten Sphäroplasten. Sphäroplasten sind Protoplasten der Zellen, deren Zellwände nur noch partiell vorhanden sind und die somit keinen intakten periplasmatischen Raum besitzen. Eine darauffolgende Aufreinigung des Proteins Acry1741 aus den verschiedenen Zellfraktionen sollte Aufschluss über die Lokalisierung des Enzyms in der Zelle geben. Um die saubere Trennung von Cytoplasma und Periplasma zu prüfen, wurde mit beiden Fraktionen ein Enzymaktivitätstest durchgeführt, bei dem die Aktivität der cytoplasmatischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase gemessen wurde. Bei einer erfolgreichen Separierung der Sphäroplasten vom Periplasma wäre lediglich in der cytoplasmatischen Fraktion die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase messbar. Durch diese Aktivitätsmessung kann sichergestellt werden, dass es zu keiner Verletzung der Sphäroplasten kam, was eine Vermischung des Cytoplasmas mit dem Periplasma zur Folge hätte. Für die Zellfraktionierung wurde weiterhin mit dem Protein Acry1741 gearbeitet, dessen erfolgreiche Produktion in *G. oxydans* BP.9 bereits nachgewiesen werden konnte (Vgl. Kapitel 3.2.4).



**Abbildung 8:** Western Blot zur Lokalisierung der, in *G. oxydans*-BP.9 produzierten, putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741. 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Acry1741, aufgereinigt aus der Cytoplasma-Fraktion nach Fraktionierung der Zellen. 3: Periplasmatische Fraktion

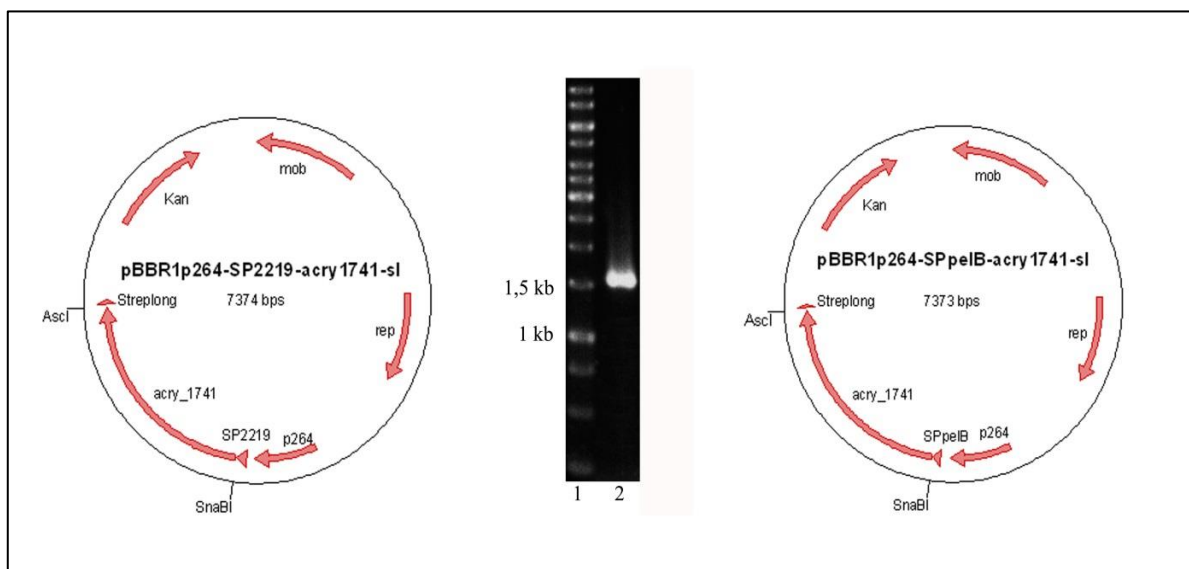
Nach einer chromatographischen Aufreinigung des Proteins sowohl aus der periplasmatischen, als auch aus der cytoplasmatischen Fraktion wurde ein Western Blot der Proteine durchgeführt. Mittels Western Blot konnte eine schwache Proteinbande in der cytoplasmatischen Elutionsfraktion detektiert werden, nicht jedoch in der Periplasma-Fraktion. Das vorhergesagte Molekulargewicht des Proteins Acry1741 ohne Signalpeptid lag bei 58,7 kDa. Da lediglich in der Cytoplasma-Fraktion eine Proteinbande auf der für Acry1741 der Höhe von 62 kDa zu detektieren war, befand sich das Protein zum Zeitpunkt der Aufreinigung im Cytoplasma (Abb. 8). Eine Neuberechnung des Molekulargewichts unter Einbezug des Signalpeptids, das im Falle einer nicht erfolgten Translation noch Teil des Proteins ist, belief sich auf eine Proteingröße von 61,3 kDa, was der Bandengröße im Western Blot entsprach. Die Inaktivität der periplasmatischen Dehydrogenasen scheint somit in dem nicht erfolgten Transport der Proteine ins Periplasma und die damit verbundene inkorrekte Faltung begründet zu liegen.

### **3.2.8 Austausch des Signalpeptids**

In den vorherigen Kapiteln konnte durch Expressionsstudien am Beispiel von *swit1054* gezeigt werden, dass eine Transkription der für die periplasmatischen Dehydrogenasen kodierenden Gene in *G. oxydans* 621H stattfindet. Des Weiteren konnte durch die Produktion des Modellproteins YliI nachgewiesen werden, dass die Inaktivität der Dehydrogenasen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf die Auswahl falscher Substrate zurückzuführen ist. Dies konnte durch die Translokationsanalyse der putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 bestätigt werden, die zeigte, dass Acry1741 im Cytoplasma lokalisiert war und somit nicht über die cytoplasmatische Membran ins Periplasma transportiert wurde, wo die Faltung des Proteins und der Einbau des PQQ erfolgt wäre. Somit kann die Inaktivität des Enzyms auf eine nicht erfolgte Translokation zurückgeführt werden.

Eine nicht erfolgte Translokation eines Proteins kann darin begründet liegen, dass das native Signalpeptid des Proteins nicht kompatibel mit dem Translokationssystem des Expressionsstammes ist. Um die Translokationseffizienz zu verbessern wurde das native Signalpeptid der putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 durch die Signalpeptide pelB und SP2219 ausgetauscht. Das pelB-Signalpeptid stammt von einer Pektat-Lyase des Organismus *Erwinia carotovora* und die SP2219-Signalsequenz bildet das Signalpeptid eines Ribose ABC-Transporters aus *G. oxydans* 621H. Studien zu der Effizienz von Signalpeptiden in *G. oxydans* 621H zeigten, dass für Fusionsproteine mit diesen Signalpeptiden eine hohe Translokationsrate vorliegt (Kosciow *et al.*, 2014). Für den Austausch des Signalpeptids

wurde das Gen *acry1741* ohne Signalsequenz amplifiziert und das erhaltene DNA-Fragment mit der Größe von 1630 bp aufgereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Sna*BI und *Asc*I geschnitten (Abb. 9). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Sna*BI und *Asc*I wurde das Gen *phoA* aus den als Vektoren dienenden Plasmiden pBBR1p264-SPpelB-*phoA* und pBBR1p264-SP2219-*phoA* entfernt und diese anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt (Kosciow *et al.*, 2014). Nach erfolgter Ligation wurden die Plasmide pBBR1p264-SP2219-*acry1741*-SI und pBBR1p264-pelB-*acry1741*-SI (Abb. 9) in *E. coli* NEB 5 alpha transformiert und aus diesem isoliert. Eine anschließende Sequenzierung der Plasmide bestätigte den erfolgreichen Austausch der Signalpeptidsequenzen.



**Abbildung 9:** Klonierung zum Austausch des nativen Signalpeptids der putativen Alkohol-Dehydrogenase *Acry1741*. Mitte: PCR zur Amplifizierung des Gens *acry1741* ohne die für das Signalpeptid codierende Nukleotidsequenz. Links: Erstelltes Expressionsplasmid pBBR1p264-SP2219-*acry1741*-SI. Die Nukleotidsequenz des nativen Signalpeptids des Gens *acry1741* wurde gegen die Nukleotidsequenz des Signalpeptids SP2219 ausgetauscht. Rechts: Erstelltes Expressionsplasmid pBBR1p264-pelB-*acry1741*-SI. Die Nukleotidsequenz des nativen Signalpeptids des Gens *acry1741* wurde gegen die Nukleotidsequenz des Signalpeptids pelB ausgetauscht. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion; Streplong: mit Linkerregion verlängerten Strep-Tag II. Die Klonierung des Gens *acry1741* erfolgte bei beiden Plasmiden über die Restriktionsschnittstellen *Sna*BI und *Asc*I.

Die Plasmide wurden mittels Elektroporation in *G. oxydans* BP.9 eingebracht. Nach Anzucht der Kulturen wurde eine Zellfraktionierung mit anschließender Proteinaufreinigung von *Acry1741* aus der cytoplasmatischen und der periplasmatischen Fraktion durchgeführt. Bei der spezifischen Detektion der PQQ-anhängigen Dehydrogenase mittels Streptactin-Konjugat konnte in keiner Zellfraktion eine *Acry1741*-spezifische Bande detektiert werden.



Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine heterologe Produktion von periplasmatischen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* möglich ist (Vgl. Kap. 3.2.2 und Kap. 3.2.4). Die produzierten Proteine lagen jedoch in inaktiver Form im Cytoplasma vor, da die Translokation der Proteine nicht stattfand und somit die Faltung im Periplasma nicht erfolgen konnte. Translokationsprobleme können in der Beschaffenheit der Signalpeptidsequenz begründet liegen, die vom Expressionsorganismus nicht unterstützt wird. Des Weiteren können strukturelle Differenzen der nicht Organismus eigenen Proteine, die Proteinsynthese erschweren. Charakteristisch für den Organismus *G. oxydans* ist die Vielzahl an Dehydrogenasen, die in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert und Hauptkomponenten des oxidativen Energiestoffwechsels sind. Zudem verfügt *G. oxydans* 621H über einige cytoplasmatische, jedoch wenige periplasmatische Dehydrogenasen. Da sich *G. oxydans* 621H für die Produktion periplasmatischer Oxidoreduktasen als nicht geeignet erwies, sollte als nächster Schritt die Produktion membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H fokussiert werden.

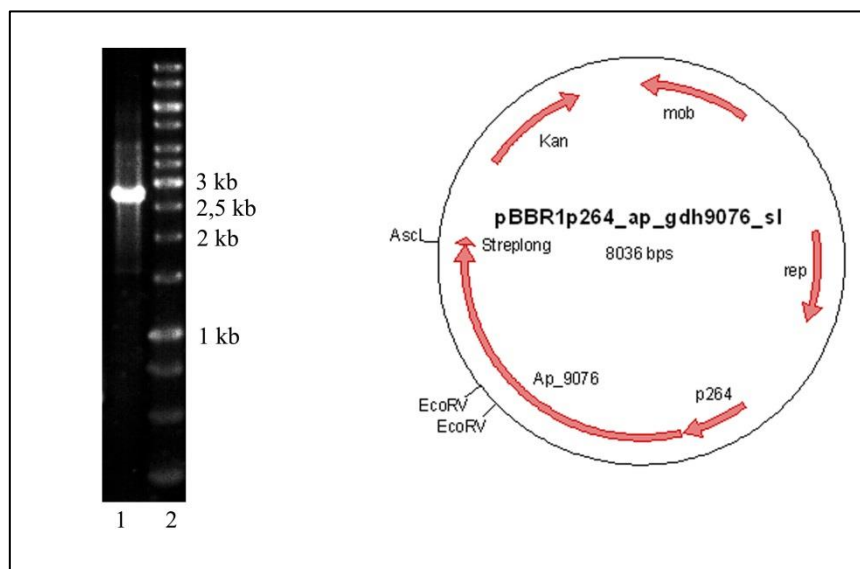
### **3.3 Produktion und Charakterisierung membrangebundener Oxidoreduktasen**

Eine Vielzahl membrangebundener Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien sind bereits in industriellen Anwendungen etabliert und werden zur Synthese industriell interessanter Stoffe, wie beispielsweise Vitamin C, eingesetzt. Die Charakterisierung weiterer membranständiger Dehydrogenasen birgt das Potential neue biotechnologische Anwendungen zu entwickeln und neuartige Enzyme zu finden, die von industriellem Nutzen sein könnten. Im folgenden Kapitel wird die Produktion und Charakterisierung der nicht charakterisierten membrangebundenen Dehydrogenasen beschrieben, die aufgrund ihrer Homologien zu bereits gut untersuchten Enzymen, ausgewählt wurden (Tab. 5).

#### **3.3.1 Erstellung von Plasmiden für die Expression membranständiger Dehydrogenasen**

Die Vektoren, die für die Expression der ausgewählten membranständigen Dehydrogenasen erstellt wurden, basierten auf den von Kallnik *et al.* entwickelten Plasmiden pBBRp264\_St und pBBRp452\_St (Kallnik *et al.*, 2012). Für die Produktion der membranständigen Dehydrogenasen wurden jeweils zwei Plasmide erstellt, die entweder den starken *p264*- oder den moderaten *p452*-Promotor besaßen. Die Expressionsplasmide verfügten, wie die Plasmide zur Produktion der periplasmatischen Dehydrogenasen, über den verlängerten Streplong, der eine Aufreinigung der membranständigen Dehydrogenasen mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Studien deuten darauf hin, dass der verlängerte Streplong nach der Faltung des

Proteins in dessen Tertiärstruktur besser zugänglich ist und dadurch eine effizientere Aufreinigung ermöglicht wird (Zeiser *et al.*, 2014; Zeiser, 2015). Membranständige Proteine, die mit Hilfe eines Detergens aus der cytoplasmatischen Membran herausgelöst wurden, liegen anschließend in einer Mizelle eingeschlossen vor. Es wird vermutet, dass der Streplong aufgrund der Verlängerung durch die Linkersequenz aus der Mizelle herausragt und die Aufreinigung der Proteine verbessert. Für die Erstellung der Plasmide zur Produktion der membranständigen Dehydrogenasen (Tab. 5), wurden zunächst die Gene der, mittels Blastp-Analysen identifizierten, nicht charakterisierten Dehydrogenasen, von der genomischen DNA des jeweiligen Organismus amplifiziert.



**Abbildung 10:** PCR zur Amplifizierung des Gens *ap9076* und erstelltes Expressionsplasmid pBBR1p264\_ap9076\_sl. Links: 1: PCR-Produkt der PCR zur Amplifizierung des Gens *ap9076* mit einer Größe von 2,5 kb; 2: 1kb DNA-Marker (Thermo Scientific). Rechts: Nach Verdau und Ligation, über die Schnittstellen *DraI* und *AscI*, erstelltes Plasmid zur Expression des Gens *ap9076*. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion; Streplong: mit Linkerregion verlängerten Strep-Tag II

Die Klonierung des Gens *ap9076*, einer putativen Glukose-Dehydrogenase, ist in diesem Kapitel beispielhaft für die Klonierung aller, für membranständige Enzyme kodierenden, Gene dargestellt. Das Gen *ap9076* wurde mit Hilfe der Primer *apgdh\_9076fw2* und *ap\_gdh9076\_rev* von der genomischen DNA des Bakteriums *A. pasteurianus* 386B amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und entsprach der erwarteten Größe von 2,5 kbp (Abb. 10). Nach der Aufreinigung des DNA-Fragments aus dem Agarosegel, wurde das Insert mit den Restriktionsenzymen *DraI* und *AscI* verdaut. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *AscI* geschnitten und zusätzlich mit alkalischer Phosphatase inkubiert. *DraI* und *EcoRV* sind Enzyme, die glatte Schnittstellen

ohne Überhang erzeugen, sodass sich die entstehenden Schnittstellen beliebig ligieren ließen. *EcoRV* konnte nicht für den Restriktionsverdau des Inserts verwendet werden, da sich im Gen *ap9076* zwei Schnittstellen für dieses Enzym befanden. Nach erfolgter Ligation, wurde das generierte Plasmid pBBR1p264\_ap9076\_S1 (Abb. 10) zur Replikation in *E. coli* NEB 5 alpha transformiert und dann mittels Elektroporation in den jeweiligen Expressionsstamm eingebracht. In gleicher Weise wurde mit den Genen verfahren, die in Tab. 9 aufgeführt sind.

### 3.3.2 Produktion membrangebundener Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR*

Die Plasmide mit den, für membrangebundene Dehydrogenasen kodierenden, Genen aus *S. wittichii*, *G. oxydans*, *A. pasteurianus*, *G. japonicus* und *G. diazotrophicus* wurden mittels Elektroporation in den Expressionsstamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* eingebracht. Von den, in Tabelle 9 aufgeführten Proteinen, war das Substrat zweier Dehydrogenasen bereits bekannt. Zu diesen zwei Dehydrogenasen zählt zum einen der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus*, der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert (Kawai *et al.*, 2013; Ameyama *et al.*, 1981a). Zum anderen ist das Protein Gox1857 als Inositol-Dehydrogenase annotiert. Unterschiedliche Hinweise bezüglich der Funktionalität von Gox1857 lieferten jedoch Studien von Peters *et al.* (2013) und Mientus *et al.* (2017), die das Enzym basierend auf Deletionsstudien als Inositol-Dehydrogenase charakterisierten, sowie von Beuzelin-Ollivier *et al.*, (2012) und Berry *et al.*, (2012), die für das Protein eine putative Funktion als Sorboson-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym der Vitamin C-Synthese, postulierten. Somit ist eine genauere Charakterisierung von Gox1857 am aufgereinigten Enzym von Interesse.

In den folgenden Kapiteln wird der Versuch der Produktion und der Charakterisierung der aufgereinigten Inositol-Dehydrogenase Gox1857 sowie weiterer, nicht charakterisierter, membrangebundener Dehydrogenasen beschrieben. Als zusätzlicher Ansatz wurden Experimente zur Produktion der Fruktose-Dehydrogenase aus *G. japonicus* NBRC3260 in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* als Modellprotein durchgeführt, um zu überprüfen, ob mit dem verwendeten Expressionssystem eine generelle Produktion membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* möglich ist. Der membranständige Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* NBRC3260 konnte in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* aktiv produziert und aufgereinigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Produktion membranständiger, aktiver Proteine in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* mit dem verwendeten Expressionssystem möglich ist. Eine genauere Charakterisierung der Fruktose-Dehydrogenase erfolgt in einem späteren Teil der Arbeit (Vgl. Kap. 3.4).

**Tabelle 9:** Produktion membranständiger Dehydrogenasen (DH) in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR

Organismus	Gen	Annotation	Lokalisierung	Promotor	Produktion	Aktivität
<i>G. oxydans</i>	<i>gox_0516</i>	PQQ-abhäng. DH	membranständig	p452	nein	
	<i>gox_1441</i>	PQQ-abhäng. DH	membranständig	p264	nein	
	<i>gox_1857</i>	Inositol DH	membranständig	p452	nein	
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_1961</i>	putat. Sorbitol-DH	membranständig	p264	nein	
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_3764</i>	putat. Sorboson DH	membranständig	p452	nein	
<i>G. japonicus</i>	<i>fdhL</i>	Fruktose-DH, gr UE	periplasmatisch	p264	ja	ja
	<i>fdhS</i>	Fruktose-DH, kl UE	periplasmatisch	p264	ja	ja
	<i>fdhC</i>	Fruktose-DH, Cyt <i>c</i>	membranständig	p264	ja	ja
<i>A. pasteurianus</i>	<i>ap_9076</i>	putat. Glukose-DH	membranständig	p264	nein	
	<i>ap_9364</i>	putat. Glukose-DH	membranständig	p264	nein	

Für die Expression der Gene wurden *G. oxydans*-Kulturen mit den jeweiligen Plasmiden in 500 ml YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1,2 kultiviert, anschließend geerntet und mittels Ultraschall lysiert. Um die Proteine aus der Membran zu lösen wurden die Membranen isoliert und die membrangebundenen Dehydrogenasen mit Hilfe des Detergenz Triton X<sub>100</sub> solubilisiert. Anschließend erfolgte die Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Von den acht zu produzierenden Enzymen konnte lediglich der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* NBRC3260 erfolgreich in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR produziert und aufgereinigt werden. Bei allen anderen Dehydrogenasen war eine spezifische Detektion mittels Western Blot nicht möglich. Um die Effizienz der Proteinproduktion zu steigern, wurde für Folgeexperimente der Expressionsstamm *G. oxydans* BP.9 verwendet. Bei der BP.9-Mutante sind alle membrangebundenen Dehydrogenasen mit Ausnahme der Lactat-Dehydrogenase deletiert, sodass sich die BP.9-Mutante, aufgrund der geringen Proteindichte in der Membran, gut für die Expression membranständiger Proteine eignen sollte.

### 3.3.3 Produktion von membranständigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* BP.9

Die Produktion der, in Tab. 10 aufgeführten, membranständigen Dehydrogenasen in der BP.9-Mutante wurde in YF-Medium durchgeführt, da die Mutante aufgrund der Deletion der Glycerol-Dehydrogenase SldAB kein Mannitol mehr verwerten kann. Die Solubilisierung der Membranproteine und die anschließende Aufreinigung verliefen wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Zwei der sieben membranständigen Dehydrogenasen, Gox1857 und Gdi3764, konnten mittels Western Blot detektiert werden (Tab. 10). Bei dem Enzym Gox1857 handelt

es sich um ein Protein mit großem industriellen Potential, da, wie zuvor beschrieben, Untersuchungen von Beuzelin-Ollivier *et al.* (2012) und Berry *et al.* (2012) Hinweise ergaben, dass es sich bei der Inositol-Dehydrogenase Gox1857 um eine L-Sorboson-Dehydrogenase handeln könnte, die L-Sorboson direkt zu L-Ascorbinsäure umsetzt. Die meisten beschriebenen L-Sorboson-Dehydrogenasen setzen Sorboson zu 2-Keto-L-Gulonsäure um, die dann in einem weiteren chemischen Syntheseschritt zu L-Ascorbinsäure (Vitamin C) umgewandelt wird (Hoshino *et al.*, 1991; Shinjoh *et al.*, 1995). Die Beschreibung einer L-Sorboson-Dehydrogenase, die L-Sorboson zu L-Ascorbinsäure umsetzt wäre somit von großem Interesse für die Pharmaindustrie, da dies die Vitaminsynthese vereinfachen und kostengünstiger gestalten könnte. Hölscher *et al.* (2007) postulierten, dass es sich bei Gox1857 um eine Inositol-Dehydrogenase handelt. Allerdings erfolgte diese Einschätzung lediglich auf Untersuchungen, die mit Hilfe einer Mutante, in der das Gen *gox1857* deletiert wurde, durchgeführt worden sind. Eine Aufreinigung und direkte Charakterisierung des Proteins ist bis heute jedoch nicht erfolgt.

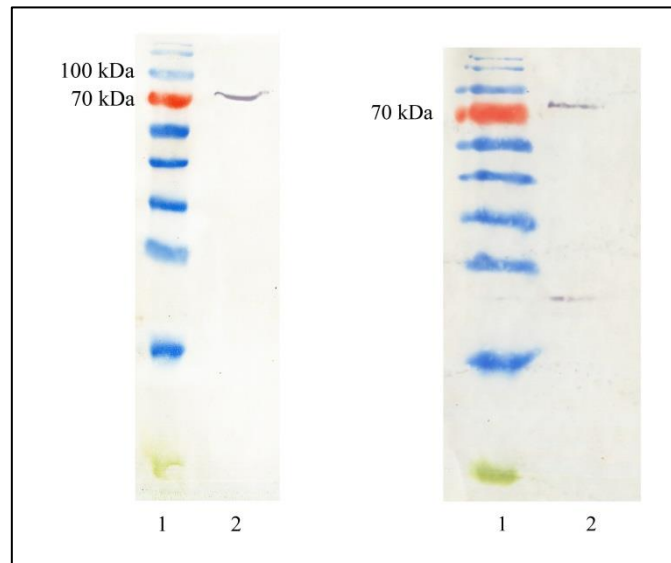
**Tabelle 10:** Produktion membranständiger Dehydrogenasen (DH) in der Mutante *G. oxydans* BP.9

Organismus	Gen	Annotation	Lokalisierung	Promotor	Produktion	Aktivität
<i>G. oxydans</i>	<i>gox_0516</i>	PQQ-abhäng. DH	membranständig	p452	nein	
	<i>gox_1441</i>	PQQ-abhäng. DH	membranständig		nein	
	<i>gox_1857</i>	Inositol-DH	membranständig	p452	ja	nein
<i>S. wittichii</i>	<i>swit_1961</i>	putat. Sorbitol-DH	membranständig	p264	nein	
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>gdi_3764</i>	putat. Sorboson DH	membranständig	p452	ja	nein
<i>A. pasteurianus</i>	<i>ap_9076</i>	putat. Glukose-DH	membranständig	p264	nein	
	<i>ap_9364</i>	putat. Glukose-DH	membranständig	p264	nein	

Das als Inositol-Dehydrogenase annotierte Enzym Gox1857 konnte erfolgreich in *G. oxydans* BP.9 produziert und aus der Membran herausgelöst werden. Die erhaltene Enzymmenge aus 500 ml Kultur lag bei 1,9 mg. Im Western Blot war Gox1857 als deutliche Bande mit einer Größe von 87 kDa zu erkennen, was mit der erwarteten Proteingröße von 88,7 kDa übereinstimmte (Abb. 11). Bei anschließenden enzymatischen Tests mit DCPIP und PMS als Elektronenakzeptoren, zeigte die Inositol-Dehydrogenase weder mit myo-Inositol, noch mit anderen Substanzen aus verschiedenen Substratklassen eine Aktivität (s. Anhang 1).

Ein entsprechendes Verhalten konnte auch bei der putativen Sorboson-Dehydrogenase Gdi3764 aus *G. diazotrophicus* beobachtet werden. Einige Sorboson-Dehydrogenasen sind

bereits beschrieben, weisen jedoch mit spezifischen Aktivitäten von  $>7$  U/mg eine geringe katalytische Effizienz auf. Des Weiteren besitzen diese Enzyme eine große Substratbreite und sind wenig spezifisch (Miyazaki *et al.*, 2006; Hoshino *et al.*, 1991; Shinjoh *et al.*, 1995; Asakura und Hoshino, 1999).



**Abbildung 11:** Western Blot der aufgereinigten Proteine Gdi3764 und Gox1857 produziert in der Mutante *G. oxydans* BP.9. Links: 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aufgereinigte Inositol-Dehydrogenase Gox1857. Rechts: 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aufgereinigte putative Sorboson-Dehydrogenase Gdi3764

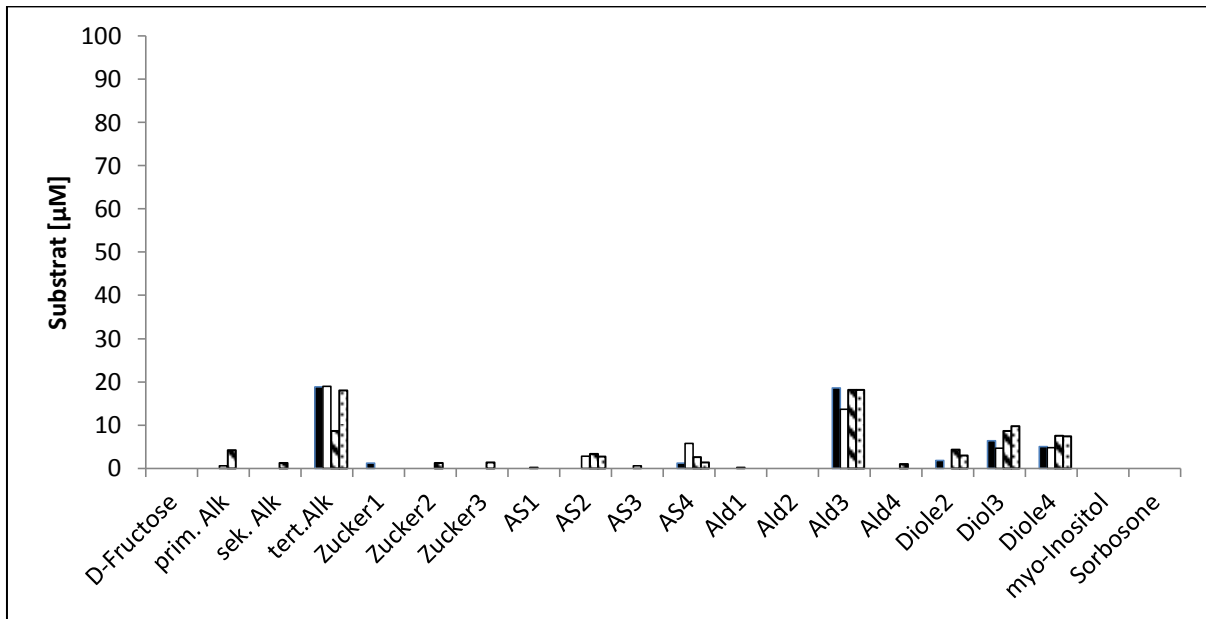
Die Identifizierung einer neuartigen Sorboson-Dehydrogenase mit einer hohen katalytischen Aktivität und einer hohen Spezifität für L-Sorboson, könnte für die Weiterentwicklung der Vitamin C-Synthese von großer Bedeutung sein. Gdi3764 besitzt laut bioinformatischer Analysen mit den Programmen SignalP und TMHMM kein Signalpeptid, jedoch eine N-terminal gelegene Transmembranhelix, über welche das Enzym in der cytoplasmatischen Membran verankert sein könnte. Vorhersagen des Programmes Phobius widersprechen diesen Analysen jedoch und postulieren ein Signalpeptid, sodass eine experimentelle Überprüfung dieser Ergebnisse notwendig war. Aufgrund der bioinformatischen Differenzen erfolgte die Proteinaufreinigung sowohl aus der solubilisierten Membranfraktion, als auch aus dem Zellüberstand nach abzentrifugieren der Membranfraktion. Dabei zeigte sich eine Lokalisierung des Proteins Gdi3764 in der löslichen Fraktion. Die erhaltene Enzymmenge betrug 0,05 mg Protein aus 500 ml Kultur. Mittels Western Blot konnte nach Solubilisierung und Aufreinigung des Proteins eine Bande von 71,3 kDa nachgewiesen werden sowie eine weitere schwache Bande auf der Höhe von 22 kDa (Abb. 11). Das erwartete Molekulargewicht der putativen Sorboson-Dehydrogenase lag bei 53,4 kDa. Das

Laufverhalten von Membranproteinen kann durch die Anhaftung von Detergenzien beeinflusst werden und sowohl zu einer Verringerung, als auch Verkürzung der Laufstrecke der Proteine führen (Rath *et al.*, 2009). Die photometrischen Aktivitätstests mit dem aufgereinigten Protein Gdi3764 wurde mit DCPIP/PMS als Elektronakzeptor sowie verschiedenen Substratklassen wie Alkohole, Diole, Zucker, Aldehyde und Aminosäuren durchgeführt (s. Anhang 1). Es konnte keine Aktivität gemessen werden.

### **3.3.4 Substratumsetzung von ganzen Zellen**

Probleme und Schwierigkeiten beim korrekten Einbau von Enzymen in die Membran, sowie die Komplexität derer Proteinstruktur führen oft dazu, dass membranständige Proteine in ihrer Apoform in Einschlusskörperchen gelagert werden oder ungefaltet im Cytoplasma vorliegen, wo sie von Proteasen degradiert werden (Baneyx und Mujacic, 2004). Es ist bekannt, dass die Überproduktion von membranständigen Proteinen und Proteinen von hoher Komplexität in *E. coli* unter besonders schonenden Bedingungen erfolgt. Dazu werden die Kulturen bei niedrigen Temperaturen und unter schwachem Schütteln inkubiert, sodass die optimalen Proteinproduktionsbedingungen nicht erreicht werden und die Synthese der Enzyme verlangsamt abläuft (Hannig und Makrides, 1998; Rosano und Ceccarelli, 2014). Außerdem werden Expressionssysteme genutzt, bei denen die Proteinproduktion gezielt durch Induktion aktiviert werden kann. Auf diese Weise kann kontrolliert werden, dass die Produktion des Proteins von Interesse in einer geeigneten Wachstumsphase des Expressionsstamms einsetzt. Solche Mechanismen für eine sanfte Proteinproduktion stehen bei *G. oxydans* nicht zur Verfügung, da der Organismus in einem nur sehr schmalen Temperaturbereich von 25 – 30°C kultiviert werden kann und keine induzierbaren Expressionssysteme für *G. oxydans* bekannt sind. Wie in vorherigen Abschnitten beschrieben, war die Produktion von membran-gebundenen Enzymen in *G. oxydans* möglich, jedoch nicht sehr effizient. Die aufgereinigten membranständigen Dehydrogenasen zeigten keine Aktivität. Die Inaktivität der Enzyme kann unter anderem auf die Verwendung nicht geeigneter Substrate zurückzuführen sein. Zudem könnte durch das Herauslösen der Dehydrogenasen aus der Membran die Tertiärstruktur der Proteine beschädigt worden sein, was zu einer Inaktivierung der Proteine führen würde. Membranproteine benötigen oftmals die Integrität in die cytoplasmatische Membran sowie bestimmte physiologische Bedingungen, die in der Zelle vorliegen, um ihre katalytische Funktion ausüben zu können. Möglichkeiten um Proteinaktivitäten zu bestimmen ohne diese aus ihrer natürlichen Umgebung zu entfernen sind Messungen an ganzen Zellen oder an präparierten Membranen. Diese Methoden sollten auch auf die, in dieser Arbeit untersuchten, membranständigen Proteine angewendet werden.

Zunächst wurden Enzymaktivitätstests an ganzen Zellen durchgeführt. Hierfür wurden eine Kultur der BP.9-Mutante sowie Kulturen von Derivaten der BP.9-Mutante, die eins der, für die Dehydrogenasen *Gox1857*, *Gdi3764*, *Swit1961* oder *Gox0516* kodierenden, Gene besaßen in YF-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 1-1,2 inkubiert.



**Abbildung 12:** Enzymaktivitätstest mit ganzen Zellen. Gemessen wurde die Umsetzung verschiedener Substrate aus unterschiedlichen Substratklassen von ganzen Zellen der *G. oxydans* BP.9-Mutante (ausgefüllte Balken), sowie der Mutanten *G. oxydans* BP.9 *gdi3764* (quergestreifte Balken), *G. oxydans* BP.9 *gox0516* (weiße Balken), *G. oxydans* BP.9 *swit1961* (schräggestreifte Balken) und *G. oxydans* BP.9 *gox1857* (gepunktete Balken). Die Substratumsetzung wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) gemessen und 1 mM Hexacyanoferrat(III) wurde als Elektronenakzeptor verwendet. Die Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt ist die Konzentration der umgesetzten Substrate nach 15-minütiger Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Substrat. Alk: Alkohole, AS: Aminosäuren, Ald: Aldehyde. Die Daten repräsentieren einen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen.

Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) gewaschen und in diesem resuspendiert, sodass die Zellsuspensionen eine  $OD_{600}$  von 4 aufwiesen. Die Zellsuspensionen wurden dann mit DCPIP/PMS oder Hexacyanoferrat(III) und einem der zu testenden Substratpakete (s. Anhang 2) in eine 96-Wellplatte gegeben und die Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 30 min im Abstand von 2 min. Der Vergleich der Umsatzgeschwindigkeit, mit der die verschiedenen Stämme das jeweilige Substrat umsetzten, sollte einen Hinweis auf das Substratspektrum der uncharakterisierten Dehydrogenasen geben. Die Enzymaktivitätstests an ganzen Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Umsatzgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Stämmen und den getesteten Substraten. Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Enzymaktivitätstests an ganzen Zellen. Über die

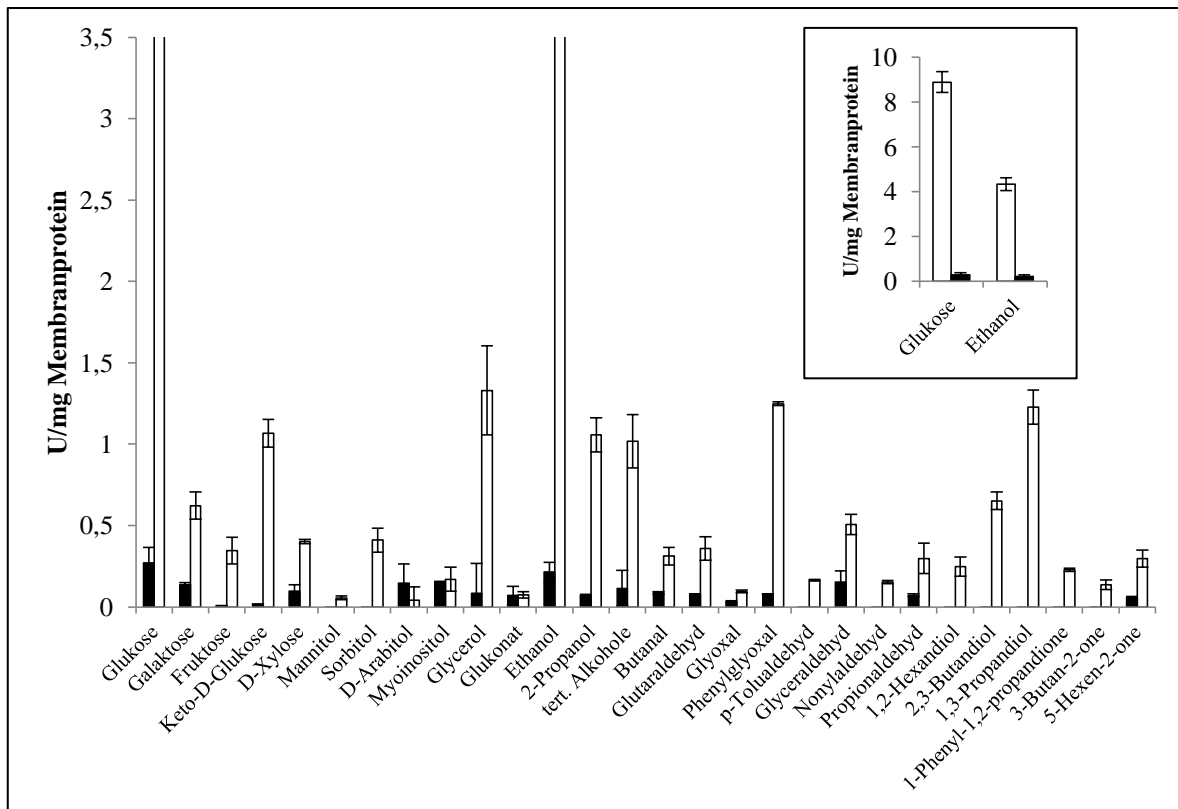


Extinktionsabnahme des Elektronenakzeptors Hexacyanoferrat(III) wurde die Konzentration des jeweiligen, durch die Zellen umgesetzten, Substrates bestimmt. Dargestellt ist die Substratkonzentration, die durch die verschiedenen BP.9-Stämme, in einem Zeitraum von 15 min umgesetzt wurde. Aus den Daten geht hervor, dass tertiäre Alkohole und Aldehyde von allen Mutanten in geringem Maß umgesetzt werden konnten. Hierbei handelt es sich vermutlich um die Aktivität von cytoplasmatischen Oxidoreduktasen, die Alkohole und Aldehyde als Substrat bedingt nutzen können. Da bei den anderen Substratklassen keine Extinktionsveränderung detektiert werden konnte, wurden diese Substrate nicht von den Zellen umgesetzt. Wiederholungen der Enzymtests an ganzen Zellen zeigten vergleichbare Ergebnisse, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen BP.9-Stämmen bezüglich der Substratumsetzung identifiziert werden konnten.

### **3.3.5 Substratumsetzung an den Membranen der *G. oxydans* BP.9-Mutante**

Für die Messung von Enzymaktivitäten an Membranen wurden Kulturen in 200 ml YF-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 angezogen. Die Zellen wurden geerntet und eine Membranpräparation durchgeführt. Anschließend wurden die Membranpellets in 40 mM KPB mit einem pH-Wert von 7 aufgenommen und die Proteinkonzentration wurde bestimmt. Die Bestimmung der Membranaktivitäten erfolgte photometrisch mit DCPIP und PMS als Elektronenakzeptoren. Als Substrate wurden verschiedene Substanzen aus den Substratklassen der Alkohole, Zucker, Aldehyde, Diolen und Aminosäuren eingesetzt (s. Anhang 1). Die Membranen der Mutanten, die die Dehydrogenasen Gox1857, Swit1961 und Gox0516 in die cytoplasmatische Membran integriert haben sollten, zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Membranen der BP.9-Mutante mit leerem Vektor (Daten nicht gezeigt). Auffällig war jedoch, dass die Membranen der BP.9-Mutante in der Lage waren Glukose, Keto-D-Glukose und Galaktose, sowie einige Alkohole umzusetzen, obwohl sie die membrangebundenen Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, nicht mehr besitzen (Peters *et al.*, 2013). Bei diesen gemessenen Enzymaktivitäten handelte es sich wahrscheinlich um Restaktivitäten cytoplasmatischer Dehydrogenasen, die trotz Waschen der Membranpellets an der Membran haften blieben. Die Membranen der Mutante *G. oxydans* BP.9 *ap9346*, die das, für die putative Glukose-Dehydrogenase kodierende, Gen *ap9346* auf einem Plasmid trug, zeigten, im Vergleich zu den Membranen der BP.9-Mutante, eine stark erhöhte Aktivität beim Umsatz von Glukose sowie von Alkoholen, Zuckeralkoholen, Zuckerderivaten, Diolen und Aldehyden (Abb. 13). Die höchsten Aktivitäten konnten dabei mit Glukose ( $8,9 \pm 0,5$  U/mg Membranprotein) und Ethanol ( $4,3 \pm 0,3$  U/mg Membranprotein) als Substrate gemessen werden. Ebenfalls erhöhte Aktivitäten von 1 - 1,3 U/mg Membranprotein konnten bei dem

Polyol Glycerol, sekundären Alkoholen wie 2-Propanol und tertiären Alkoholen aufgezeichnet werden.



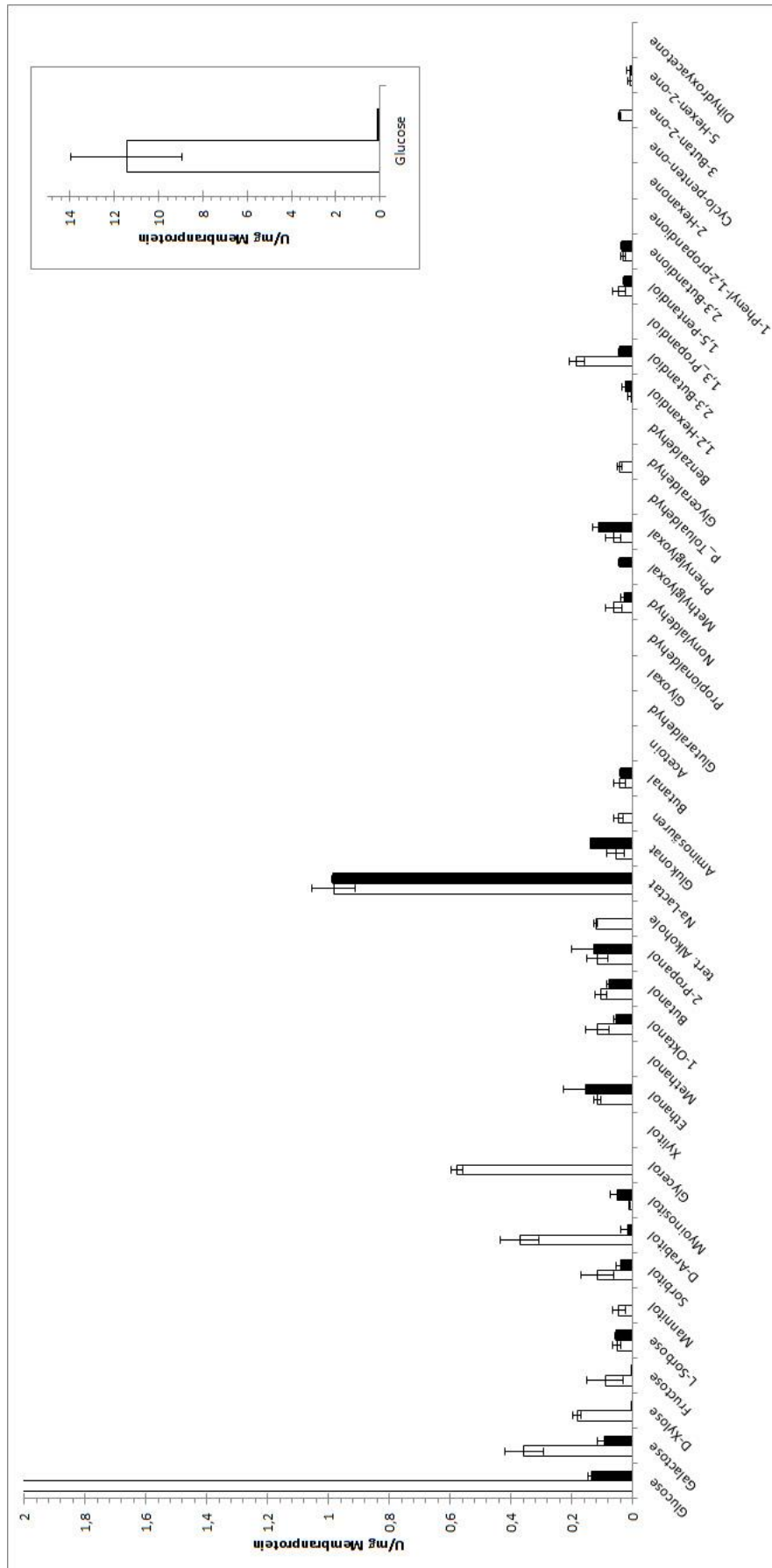
**Abbildung 13:** Substratumsatz der Membranfraktionen von den Mutanten *G. oxydans* BP.9 (schwarze Balken) und *G. oxydans* BP.9 ap9346 (weiße Balken). Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KBP (pH 7) bei 30°C durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren wurde 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS verwendet. Die Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt ist die spezifische Aktivität pro mg Membranprotein der Membranfraktionen mit verschiedenen Substraten unterschiedlicher Substratklassen.

Des Weiteren konnten unter anderem Aldehyde wie Phenylglyoxal und Glycerinaldehyd, sowie Diole wie 2,3-Butandiol und 1,3-Propandiol mit Aktivitäten von 0,6 - 1,3 U/mg Membranprotein von der Mutante *G. oxydans* BP.9 ap9346 umgesetzt werden. Zur genaueren Differenzierung der Spezifität von Ap9346, wurden weitere Aktivitätsmessungen mit weiteren primären Alkoholen als Substrate durchgeführt. Es zeigte sich, dass die *G. oxydans* BP.9ap9346-Mutante neben Ethanol auch 1-Butanol sowie 1-Oktanol umsetzen konnte (Tab. 11). Die gemessenen Aktivitäten von  $4,4 \pm 0,2$  U/mg Membranprotein für 1-Butanol und  $3,6 \pm 0,1$  U/mg Membranprotein für 1-Oktanol legen nahe, dass es sich bei der Dehydrogenase Ap9346 mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Glukose-Dehydrogenase mit sehr breitem Substratspektrum handelt, die neben Glukose vornehmlich primäre Alkohole umsetzt.

**Tabelle 11:** Umsatz primärer Alkohole der Stämme *G. oxydans* BP.9 und *G. oxydans* BP.9 ap9346

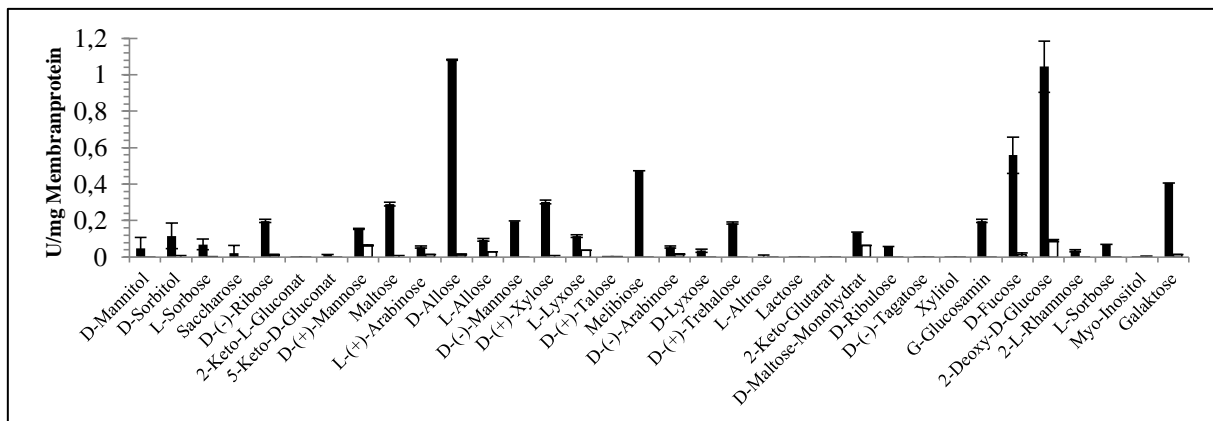
<b>Substrat</b>	<b>Membranaktivität <i>G. oxydans</i> BP.9ap9346</b> <b>[U/mg Membranprotein]</b>	<b>Membranaktivität <i>G. oxydans</i> BP.9</b> <b>[U/mg Membranprotein]</b>
Methanol	<0,1	<0,1
Ethanol	4,3 ± 0,3	0,18 ± 0,04
1-Butanol	4,4 ± 0,1	0,16 ± 0,05
1-Octanol	3,6 ± 0,1	<0,1

Neben der Mutante *G. oxydans* BP.9, die die Glukose-Dehydrogenase Ap9346 produzierte (*G. oxydans* BP.9 ap9346), konnten auch bei der Mutante *G. oxydans* BP.9, die das Gen für die putative Glukose-Dehydrogenase Ap9076 auf einem Plasmid exprimierte (*G. oxydans* BP.9 ap9076), deutliche Unterschiede bezüglich der Membranaktivitäten im Vergleich zur *G. oxydans* BP.9-Mutante beobachtet werden. Die Membranen der Mutante *G. oxydans* BP.9 ap9076 zeigten bei der Oxidation von mehreren Zuckern sowie bei einigen Zuckeralkoholen höhere Aktivität als die Membranen der *G. oxydans* BP.9-Mutante (Abb. 14). Für Aldehyde, Alkohole und die meisten Diole konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Membranaktivitäten detektiert werden. Sowohl die Membranen der *G. oxydans* BP.9-Mutante, als auch der *G. oxydans* BP.9 ap9076-Mutante waren den Erwartungen entsprechend in der Lage Laktat umzusetzen, da die Laktat-Dehydrogenase die einzige membranständige Dehydrogenase ist, die die *G. oxydans* BP.9-Mutante noch besitzt. Die Membranen der *G. oxydans* BP.9 ap9067-Mutante wiesen, mit einem Wert von 11,4 U/mg Membranprotein mit Glukose als Substrat, eine 42-fach höhere Aktivität auf als die Membranen der *G. oxydans* BP.9-Mutante. Zu weiteren Substraten bei denen die *G. oxydans* BP.9 ap9076-Mutante erhöhte Umsatzgeschwindigkeiten zeigte, zählten der Zucker Galaktose, die Zuckeralkohole Arabitol und Sorbitol, das Polyol Glycerol sowie das Diol 2,3-Butandiol. Somit konnte die Annotation des Enzyms Ap9076 als Glukose-Dehydrogenase, die neben Zuckern auch Polyole umsetzen kann, bestätigt werden.



**Abbildung 14:** Substratumsatz durch die Membranfraktionen der Mutanten *G. oxydans* BP.9 (schwarze Balken) und *G. oxydans* BP.9 ap9076 (weiße Balken). Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KBP (pH 7), bei 30°C durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren wurden 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS eingesetzt. Die jeweilige Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt ist die spezifische Aktivität pro mg Membranprotein der Membranfraktionen mit verschiedenen Substraten unterschiedlicher Substratklassen.

Um das Substratspektrum der Glukose-Dehydrogenase zu spezifizieren, wurden weitere Enzymaktivitätstests mit verschiedenen Zuckern und Zuckerderivaten durchgeführt. Es zeigte sich, dass neben Glukose und Galaktose eine Vielzahl anderer Zucker, Zuckeralkohole und Zuckerderivate von den Membranen der *G. oxydans* BP.9 ap9076-Kultur umgesetzt wurden (Abb. 15). Dabei konnten deutliche Unterschiede zu den Membranen der BP.9-Mutante beobachtet werden. Die höchsten Aktivitäten der *G. oxydans* BP.9 ap9076-Membranen konnten mit D-Allose, D-Fucose und 2-Desoxy-D-Glukose gemessen werden. Außerdem wurden die Substrate D-Sorbitol, D-Ribose, D-Mannose, Maltose, L-Arabinose, L-Allose, D-Xylose, L-Lyxose, Melibiose, D-Arabinose, D-Lyxose, D-Trehalose und 2-L-Rhamnose umgesetzt. Diese Ergebnisse deuteten stark darauf hin, dass es sich bei der Dehydrogenase Ap9076 um eine Glukose-Dehydrogenase handelt, die vornehmlich Aldosen oxidieren kann.

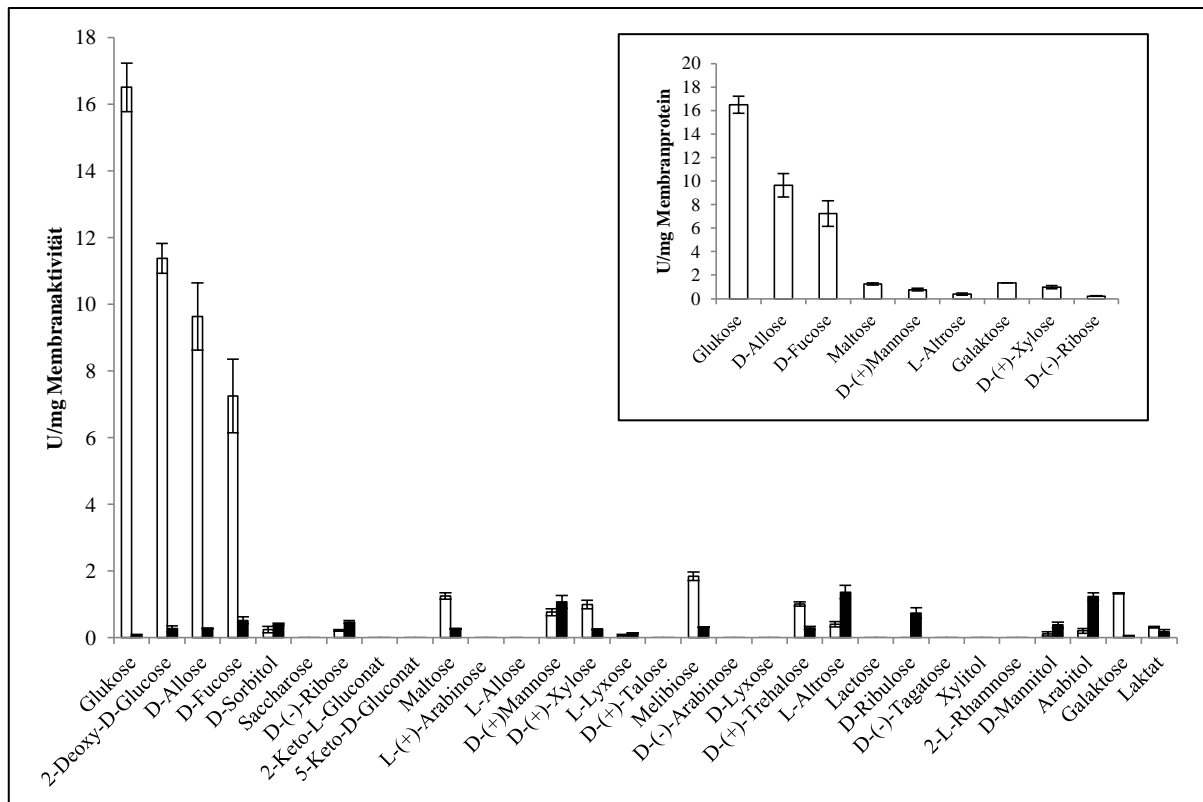


**Abbildung 15:** Substratspektrum der Mutanten *G. oxydans* BP.9 (weiße Balken) und *G. oxydans* BP.9 ap9076 (schwarze Balken), die das Gen der putativen Glukose-Dehydrogenase Ap9076 aus *A. pasteurianus* 386B besitzt. Gemessen wurde die Aktivität der Membranen mit verschiedenen Zuckern, Zuckeralkohole und Zuckerderivaten als Substrat. Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KBP (pH 7), bei 30°C durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren wurden 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS eingesetzt. Die jeweilige Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt ist die spezifische Aktivität pro mg Membranprotein der Membranfraktionen mit verschiedenen Substraten.

Versuche, die Proteine Ap9076 und Ap9346 aus der Membran zu solubilisieren und aufzureinigen, waren nicht erfolgreich, sodass ein alternativer Ansatz zur Bestätigung der Charakterisierung des Enzyms Ap9076 als Glukose-Dehydrogenase gewählt wurde. Hierfür wurde das Plasmid pBBR1p264-ap9076-sl in die Mutante *G. oxydans*  $\Delta$ mgdh eingebracht, in der das, für die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase kodierende, Gen *gox0256* deletiert ist. Durch eine Expression des Gens *ap9076* in *G. oxydans*  $\Delta$ mgdh und den Vergleich von Membranaktivitäten sollte bestätigt werden, ob es sich bei dem Enzym aus *A. pasteurianus* 386B tatsächlich um eine Glukose-Dehydrogenase handelte.

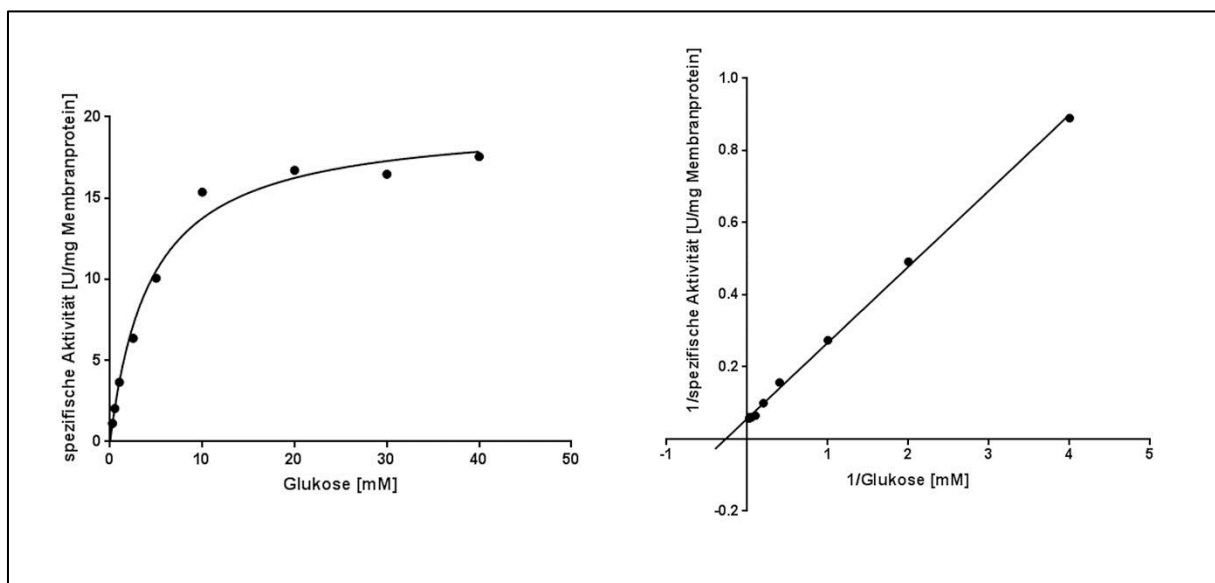
### 3.3.6 Substratumsetzung an den Membranen der *G. oxydans* $\Delta$ *mgdh*-Mutante

Zu weiteren Untersuchungen der Glukose-Dehydrogenase Ap9076 wurden Kulturen der Mutanten *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* und *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* ap9076 in YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Membranpräparationen durchgeführt. Die Membranpellets wurden in 40 mM KPB (pH 7) aufgenommen. Mittels Bradford Reagenz wurde die Membranproteinkonzentration bestimmt. Dann wurden Aktivitätstests mit den Membranen durchgeführt, bei denen DCPIP und PMS als Elektronenakzeptoren und verschiedene Zucker, Zuckerderivate sowie Zuckeralkohole als Substrat verwendet wurden. Die Aktivitätstests zeigten, dass die Membranen der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* ap9076-Mutante in der Lage waren eine Vielzahl von Aldosen zu oxidieren, im Gegensatz zu den Membranen der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh*-Mutante, die keinen der getesteten Zucker umsetzen konnte (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Substratumsatz der Membranen von den Mutanten *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* (schwarze Balken) und *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* ap9076 (weiße Balken). Gemessen wurde die Aktivität der Membranen mit verschiedenen Zuckern, Zuckeralkohole und Zuckerderivaten als Substrat. Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KPB (pH 7), bei 30°C durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren wurden 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS eingesetzt. Die Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt ist die spezifische Aktivität pro mg Membranprotein der Membranfraktionen mit verschiedenen Substraten.

Mit Ketosen als Substrate konnten keine Aktivitäten aufgezeichnet werden. Innerhalb der Aldosen zeigte sich, dass die Membranen der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh ap9076*-Mutante bei C<sub>6</sub>-Zuckern wie Fucose, Allose, Glukose, Galaktose und Maltose deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen als mit C<sub>5</sub>-Zuckern wie Xylose und Lyxose. Die Membranaktivitäten mit C<sub>5</sub>-Aldosen betragen 0,2 – 1 U/mg Membranprotein. Mit Arabinose und Ribose als Substrate konnten keine Aktivität gemessen werden. Für die C<sub>6</sub>-Aldosen wurden die höchsten Membranaktivitäten mit Glukose ( $16,5 \pm 0,7$  U/mg Membranprotein), Allose ( $9,6 \pm 1$  U/mg Membranprotein) und Fucose ( $7,3 \pm 1,1$  U/mg Membranprotein) detektiert. Die Membranaktivitäten mit weiteren C<sub>6</sub>-Aldosen lagen zwischen 0,4 und 1,3 U/mg Membranprotein. Es ergaben sich zudem Hinweise darauf, dass die Membranen der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh ap9076*-Mutante die Disaccharide Melibiose und Trehalose umsetzen konnten. Glukonate konnten von den Membranen nicht oxidiert werden und bei den Zuckeralkoholen Arabitol, Sorbitol und Mannitol konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Membranen der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh*-Mutante und der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh ap9076*-Mutante verzeichnet werden.



**Abbildung 17:** Abhängigkeit der Membranaktivität der Mutante *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh ap9076* von der Substratkonzentration. Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KPB (pH 7) und mit 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS als Elektronenakzeptoren durchgeführt. Als Substrat wurde Glukose eingesetzt. Links: Michaelis-Menten-Auftragung. Rechts: Lineweaver-Burk-Auftragung. Die nicht lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

Der Vergleich der Membranaktivitäten der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh*-Mutante und der *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh ap9076*-Mutante zeigte deutlich, dass es sich bei dem Protein Ap9076 um eine Glukose-Dehydrogenase handelt, die Aldosen umsetzt. Da die höchste Aktivität des Enzyms mit Glukose beobachtet werden konnte, wurde mit den Membranen der

*G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* *ap9076*-Mutante eine Michaelis-Menten-Kinetik aufgezeichnet, um den  $K_M$ -Wert und den  $V_{max}$ -Wert der Dehydrogenase Ap9076 für Glukose zu bestimmen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, mit dessen Hilfe eine nicht lineare Regression erstellt wurde. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, erreichte die Michaelis-Menten-Kurve zwischen 10 mM und 20 mM Glukose einen Sättigungsbereich. Die maximale Aktivität, die gemessen wurde, lag bei  $16,7 \pm 0,5$  U/mg Membranprotein. Der  $K_M$ -Wert für Glukose wurde mittels Lineweaver-Burk-Plots bestimmt und lag bei  $4 \pm 0,1$  mM. Die, über die Geradengleichung des Lineweaver-Burk-Plots bestimmte, maximale Aktivität  $V_{max}$ , betrug  $19,5 \pm 0,3$  U/mg Membranprotein. Somit konnten durch die Expression der Gene *ap9346* und *ap9076* in den Mutanten *G. oxydans* BP.9 und *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* zwei bisher nicht charakterisierte PQQ-abhängige Dehydrogenasen aus *A. pasteurianus* 386B als eine Aldose-Dehydrogenase (Ap9076) und eine Glukose-Dehydrogenase mit sehr breitem Substratspektrum (Ap9346) identifiziert werden. Vergleiche der Membranaktivitäten zeigten, dass es sich bei beiden Enzymen um Glukose-Dehydrogenasen handelt, die sich jedoch in ihrem Substratspektrum unterscheiden. Die Glukose-Dehydrogenase Ap9346 oxidierte neben Glukose vornehmlich primäre Alkohole, wohingegen die Glukose-Dehydrogenase Ap9076 die höchsten Aktivitäten mit  $C_6$ -Aldosen aufwies.

### 3.4 Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex

Wie in Kapitel 3.3.2 erwähnt, konnte der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* NBRC3260 in aktiver Form im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* produziert werden. Die Fruktose-Dehydrogenase oxidiert D-Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose, einem Zuckerderivat, das eine ähnliche Süßkraft wie Fruktose aufweist (persönliche Mitteilung, M. Sc. Elena Herweg, RWTH Aachen). 5-Keto-D-Fruktose kann vom menschlichen Organismus nicht, oder nur teilweise metabolisiert werden, sodass diese Verbindung nur einen sehr geringen Kaloriengehalt aufweist (Wyrobnik *et al.*, 2012). Diese Eigenschaften machen 5-Keto-D-Fruktose zu einem interessanten neuen Süßstoff, sodass in den letzten zwei Teilen dieser Arbeit die Charakterisierung des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes sowie die Entwicklung einer biotechnologischen Anwendung basierend auf diesem Enzymkomplex zur einfachen und günstigen Produktion von 5-Keto-D-Fruktose in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* im Vordergrund standen.

Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex besteht aus einer kleinen (FdhS) und einer großen Untereinheit (FdhL) sowie einem Cytochrom *c* (FdhC). Bioinformatische Analysen und



Proteinmodellierungen zeigen, dass sich die beiden Untereinheiten FdhS und FdhL im Periplasma befinden und über das Cytochrom *c*, das eine C-terminale Transmembranhelix aufweist, mit der Membran verbunden sind. Das Cytochrom *c* verfügt über drei Häm-Bindemotive (CxxCH) von denen bei zweien in unmittelbarer Nähe ein Histidin liegt, das als potentieller axialer Liganden fungieren könnte (Abb. 18).

```

MRYFRPLSATAMTTVLLLAGTNVRAQPTPEPTPASAHKPSISRGHYLAIAADCAACHTNGR
DGQFLAGGYAISSPMGNIYSTNITPSKTHGIGNYTLEQFSKALRHGIRADGAQLYPAMPY
DAYNRLTDEDVKS LYAYIMTEVKPVDAPSPKTQLPFPFSIRASLGIWKAARI EGKPYVF
DHTHNDWDNRGRYLVDELAHCGECHTPRNFLAPNQSAAYLAGADIGSWRAPNITNAPQSG
IGSWSDQDLFQYLKGTGKTAHARAAGPMAEAEIHS LQYLPDADISAIVTYLRSVPAKAESG
QTVANFEHAGRPS SYSVANANSRRSNSLTTKTTDGAALYEAVCASCHQSDGKGSKDGYYP
SLVGNTTTTGQLNPNDLIASILYGVDRRTDNHEILMPAFGPD SLVQPLTDEQIATIADYVL
SHFGNAQATVSADAVKQVRAGGKQVPLAKLASPGVMLLLGTGGILGAILVVAGLWWLISR
RKKRSA

```

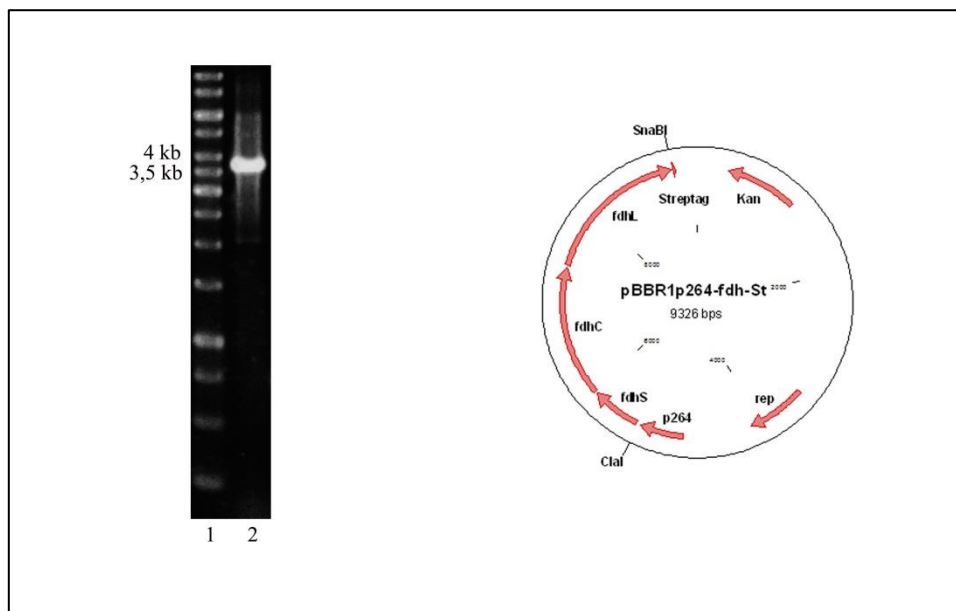
**Abbildung 18:** Aminosäuresequenz der Cytochrom *c*-Untereinheit (FdhC) des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes aus *G. japonicus* NBRC3260. In der Sequenz markiert sind das Sec-Signalpeptid (gepunktete Linie), die Häm-Bindemotive CxxCH mit den potentiellen Liganden (durchgehende Linie) und der C-terminale Membrananker (gestrichelte Linie).

Des Weiteren konnte in der Aminosäuresequenz des Cytochrom *c* ein Signalpeptid für den Sec-abhängigen Transport über die Membran identifiziert werden. Für die kleine Untereinheit des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes konnte ein Tat-abhängiges Signalpeptid und für die Aminosäuresequenz der großen Untereinheit eine FAD-Bindestelle bestimmt werden. Das aktive Zentrum befindet sich in der FdhL-Einheit des Enzymkomplexes. Die bioinformatischen Analysen deuten darauf hin, dass die Cytochrom *c*-Einheit separat von den restlichen Untereinheiten in einem ungefalteten Zustand über die cytoplasmatische Membran transportiert und in diese C-terminal integriert wird. Die Faltung des Proteins und der Einbau der Häme erfolgt im Periplasma. Da FdhL über kein eigenes Signalpeptid verfügt, könnte dies auf einen Co-Transport zusammen mit der Untereinheit FdhS hindeuten. Dies würde bedeuten, dass die Faltung der Proteine im Cytoplasma stattfindet und die Untereinheiten eine Bindung eingehen, die beim Transport über das Tat-Translokationssystem bestehen bleibt.

### 3.4.1 Klonierung der Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL* aus *G. japonicus* NBRC3260

Für die Erstellung eines Expressionsplasmides zur Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes aus *G. japonicus* NBRC3260 in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* wurden die Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL*, die für die kleine, die Cytochrom *c*- und die große Untereinheit des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes kodieren, ausgehend von der genomischen DNA des Bakteriums

*G. japonicus* NBRC3260 amplifiziert. Die Gene liegen in einem Gencluster hintereinander kodiert. Die Amplifizierung der Gene erfolgte mit Hilfe der Primer frucdh\_ClaI-f und frucdh\_SnaBI-r und das 3,6 kb große PCR-Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt (Abb. 19). Anschließend wurde das Amplifikat sowie der Vektor pBBR1p264-St mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *SnaBI* verdaut. Der Vektor wurde zusätzlich mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach erfolgter Ligation von Insert und Vektor wurde das rekombinante Plasmid pBBR1p264-fdh-St (Abb. 19) in *E. coli* NEB 5 alpha transformiert und repliziert.

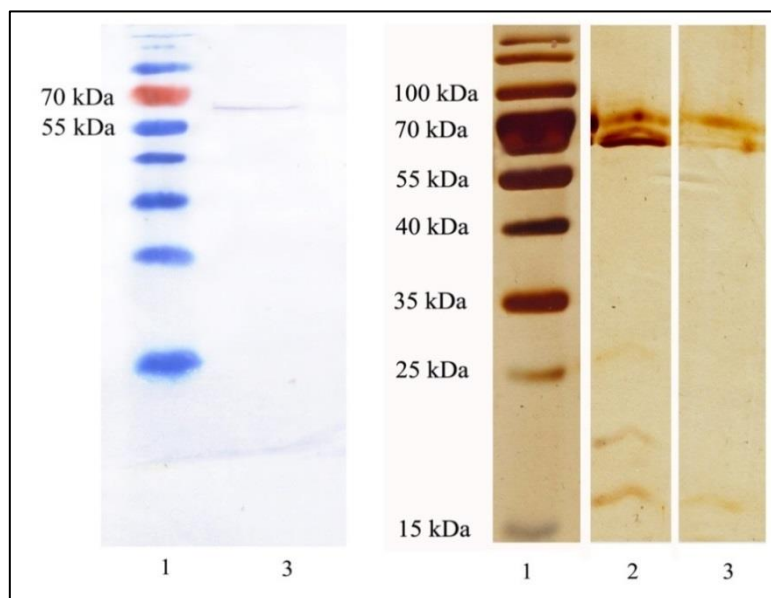


**Abbildung 19:** PCR zur Amplifizierung der Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL* und rekombinantes Expressionsplasmid pBBR1p264-fdh-St. Links: 1: PCR-Produkt der PCR zur Amplifizierung der Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL* mit einer Größe von 3,6 kb; 2: 1kb DNA-Marker (Thermo Scientific). Rechts: Nach Verdau und Ligation, über die Schnittstellen *ClaI* und *SnaBI*, erstelltes Plasmid zur Expression der Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL*. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion.

### 3.4.2 Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes in *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR*

Das Expressionsplasmid pBBR1p264-fdh-St wurde mittels Elektroporation in den Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* eingebracht. Der daraus resultierende Stamm wurde *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* genannt. Für die Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes wurde der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* in 500 ml YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,2 herangezogen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Anschließend wurde der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex über den, an die große Untereinheit fusionierten, Strep-Tag mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Da wenig über die Interaktion der drei Proteine FdhL, FdhS und FdhC bekannt ist, konnte die Stärke der

Bindung zwischen den Untereinheiten nicht genau definiert werden. Besteht lediglich eine schwache Bindung zwischen den Untereinheiten FdhL/FdhS und dem Cytochrom *c*, könnten FdhS und FdhL nach Zellaufschluss als Einheit löslich im Periplasma vorliegen und somit aus der periplasmatischen Fraktion aufgereinigt werden. Liegt jedoch eine starke Interaktion aller drei Untereinheiten vor, müsste vor der Aufreinigung ein Herauslösen des Cytochrom *c* aus der Membran erfolgen. Aus diesem Grund wurde die Proteinaufreinigung sowohl mit der periplasmatischen Fraktion, als auch mit den solubilisierten Membranproteinen durchgeführt. Aus der periplasmatischen Fraktion konnten 0,324 mg Protein aus 500 ml Kultur isoliert werden und aus der solubilisierten Membranfraktion 0,25 mg Protein aus 500 ml Kultur.



**Abbildung 20:** Western Blot und Silberfärbung der aufgereinigten Untereinheiten FdhL und FdhS des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes aus *G. japonicus* NBRC3260 heterolog produziert in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR*. 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aus der löslichen Fraktion aufgereinigte FdhL- und FdhS Einheit des Fdh-Komplexes. 3: Aus der Membranfraktion nach Solubilisierung aufgereinigte FdhL- und FdhS Einheit des Fdh-Komplexes.

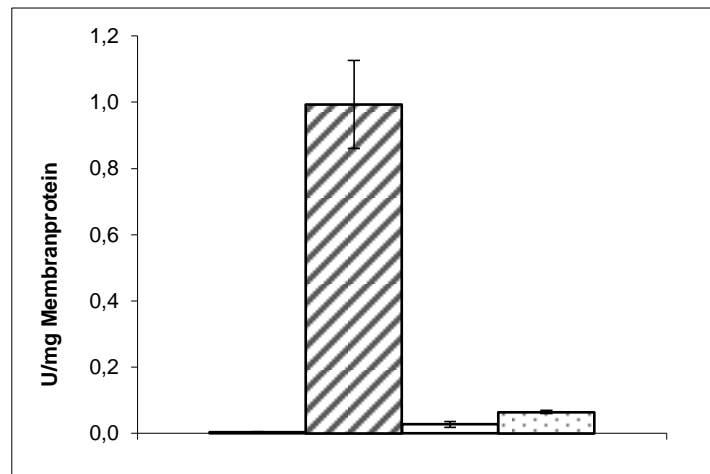
Die Silberfärbung der aus der Membranfraktion isolierten Fruktose-Dehydrogenase zeigte eine Doppelbande mit den Größen von 61 kDa und 75 kDa sowie eine Bande von 17 kDa (Abb. 20). Die 61 kDa-Bande kann der großen Untereinheit FdhL zugeordnet werden, was eine spezifische Anfärbung mittels Streptactin-Konjugat im Western Blot bestätigte (Abb. 20). Bei der Proteinbande von 17 kDa handelt es sich höchstwahrscheinlich um die kleine Untereinheit FdhS des Enzymkomplexes, die ein berechnetes Molekulargewicht von 16,8 kDa aufweist. Die 75 kDa-Bande kann vermutlich einer Kontamination zugeordnet werden. In der Silberfärbung des Proteineluats der aus der löslichen Fraktion aufgereinigten Fruktose-Dehydrogenase waren zusätzlich zu den 75 kDa-, 61 kDa- und 17 kDa-Banden,

zwei weitere Proteinbanden mit Größen von 19 kDa und 27 kDa detektierbar. Diese zusätzlichen Proteinbanden konnten auch von Kawai *et al.* (2013) beobachtet werden, die diese als Kontaminationen identifizierten. In keiner der Silberfärbungen war eine Bande von 50 kDa, die der dritten Untereinheit FdhC entsprochen hätte, zu erkennen und auch Aufnahmen eines Proteinspektrums zeigten keine für ein Cytochrom *c* typische Absorptionsmaxima (Daten nicht gezeigt). Die bestimmten spezifischen Aktivitäten der isolierten Proteinelutionsfraktionen zeigten deutliche Unterschiede. Für die Fruktose-Dehydrogenase, die aus der periplasmatischen Fraktion isoliert wurde, konnte eine spezifische Aktivität von  $63,9 \pm 4,3$  U/mg gemessen werden, wohingegen der solubilisierte Proteinkomplex aus der Membranfraktion eine spezifische Aktivität von  $127 \pm 7,7$  U/mg aufwies. Die Unterschiede in der spezifischen Aktivität können auf die zusätzlichen Kontaminationen im, aus der löslichen Fraktion isolierten, Proteineluat zurückgeführt werden, da die Proteinmenge in die Berechnung der spezifischen Aktivität einfließt.

### **3.4.3 Vergleich von Membranaktivitäten von *G. japonicus* NBRC3260 und *G. oxydans* 621H $\Delta$ hdsR fdh**

Um die Aktivität des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes in den Membranen von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR fdh im Vergleich zum nativen Organismus *G. japonicus* NBRC3260 zu analysieren, wurden Aktivitätstest an Membranen durchgeführt. Hierfür wurden Membranen der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR, *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR fdh sowie von *G. japonicus* NBRC3260 präpariert. Für *G. japonicus* NBRC3260 wurden zwei Ansätze entweder mit Mannitol oder mit Fruktose als Kohlenstoffquelle gewählt, da nicht bekannt ist, ob die *fdh*-Gene konstitutiv exprimiert werden oder die Produktion des Proteins von einer externen C-Quelle abhängt. Mit den isolierten Membranen wurden Aktivitätstest mit DCPIP und PMS als Elektronenakzeptoren in 40 mM KPB (pH 7) und mit 20 mM Fruktose als Substrat durchgeführt. Es zeigte sich, dass die höchste Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase von  $0,99 \pm 0,13$  U/mg Membranprotein im *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR fdh-Stamm gemessen werden konnte (Abb. 21). Für die Membranen des Wildtyp-Stammes von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR konnte nur eine sehr geringe Fruktose-Oxidationsrate ( $< 0,005$  U/mg Membranprotein) detektiert werden. Die Membranen von *G. japonicus* NBRC3260 wiesen eine Fruktose-Dehydrogenase-Aktivität bei Wachstum mit Mannitol als C-Quelle von  $0,027 \pm 0,009$  U/mg Membranprotein auf und mit Fruktose als C-Quelle konnte eine Aktivität von  $0,065 \pm 0,005$  U/mg Membranprotein gemessen werden. Somit war die Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase bei einer heterologen Expression in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR im Vergleich zu *G. japonicus* NBRC3260 um ein 15-faches erhöht, sodass der Stamm

*G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR fdh* für die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose verwendet wurde.



**Abbildung 21:** Vergleich der Aktivität des Fdh-Komplexes in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* und *G. japonicus* NBRC3260. Dargestellt sind die Membranaktivitäten der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* (schwarzer Balken), *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR fdh* (gestreifter Balken), *G. japonicus* angezogen mit Mannitol als C-Quelle (weißer Balken) und *G. japonicus* NBRC3260 angezogen mit Fruktose als C-Quelle (gepunkteter Balken). Die Aktivitätstests wurden mit 20 mM Fruktose als Substrat, in 40 mM KPb pH 7 durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren wurden 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS verwendet.

### 3.5 Die Produktion des potentiellen Süßungsmittels 5-Keto-D-Fruktose

Durch die erfolgreiche Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes aus *G. japonicus* NBRC3260 wurde ein enzymatischer Weg erschlossen, D-Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose umzuwandeln. 5-Keto-D-Fruktose kommt natürlicherweise in Weißwein (Ramos *et al.*, 2012), Honig und Holunderblütensirup vor und hat eine ähnlich starke Süßkraft wie Fruktose (Vgl. Kap. 3.5.3.3; persönliche Mitteilung, M. Sc. Elena Herweg, RWTH Aachen). Vorversuche deuten darauf hin, dass 5-Keto-D-Fruktose von Vertretern der menschlichen Darmflora, wie Arten der Gattungen *Prevotella* und *Bacteroides* und auch *E. coli*, nicht als Wachstumssubstrat genutzt werden kann (persönliche Mitteilung M. Sc. Thomas Franke, Universität Bonn). Dies verleiht dem Fruktosederivat 5-Keto-D-Fruktose das Potential ein neuer, kalorienarmer Süßstoff zu werden. In der Lebensmittelindustrie besteht ein hoher Bedarf an artifiziellen Süßstoffen. Oftmals besitzen diese Verbindungen jedoch Nebenwirkungen und wirken sich unverträglich auf den menschlichen Metabolismus aus (Suez *et al.*, 2015). Die Identifizierung neuer, nicht artifizieller Süßungsmittel mit geringem Kaloriengehalt ist demnach von großem industriellem Interesse. Des Weiteren kann die Entwicklung eines einfachen und effizienten Verfahrens zur Herstellung eines solchen neuen, nicht artifiziellen Süßstoffes die zur Zeit aufwendigen und kostspieligen chemischen

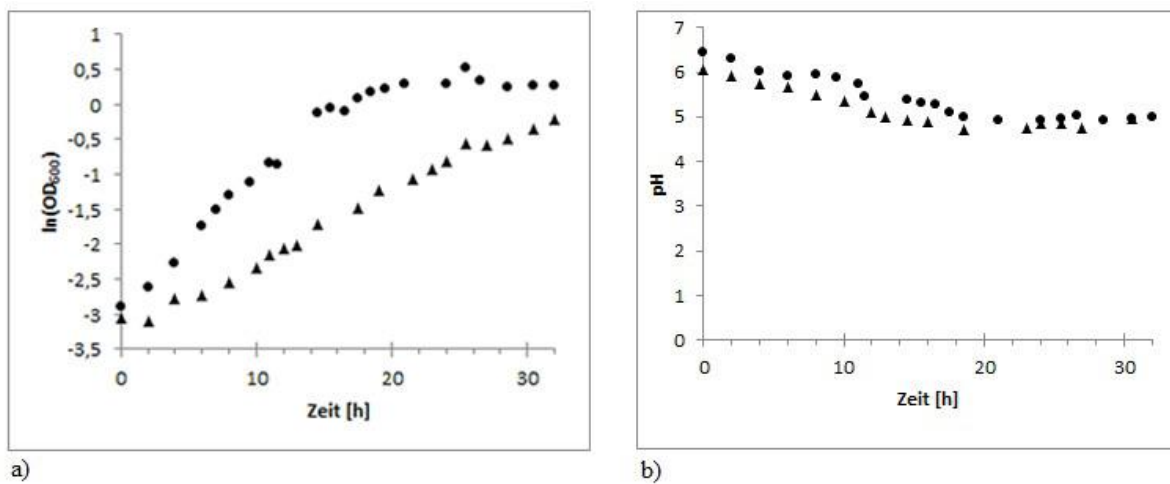
Syntheseverfahren ersetzen, sodass die erhöhte Nachfrage dieser Süßungsmittel gedeckt werden kann.

### 3.5.1 Umsetzung von D-Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose in wachsenden Zellen

*G. oxydans* 621H ist in der Lage, Fruktose als C-Quelle zum Wachstum zu nutzen. Da der Organismus jedoch nicht über eine membrangebundene Fruktose-Dehydrogenase verfügt, kann Fruktose nicht durch fermentative Oxidation an der cytoplasmatischen Membran umgesetzt werden, sondern wird ins Cytoplasma aufgenommen. Im Cytoplasma wird Fruktose von Kinasen phosphoryliert und in den Pentosephosphat-, oder alternativ in den Entner-Doudoroff-Weg eingespeist und zu Acetat oxidiert (Parmentier *et al.*, 2005; Prust *et al.*, 2005). Diese Art der Energiekonservierung läuft um ein Vielfaches langsamer ab, als die Oxidation von Substraten durch membranständige Dehydrogenasen an der cytoplasmatischen Membran und die Einspeisung der daraus gewonnenen Elektronen über Ubichinon in die Atmungskette (Deppenmeier *et al.*, 2002; Matsushita *et al.*, 1994). Durch die Integration des membranständigen Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes in die cytoplasmatische Membran von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* wäre der Organismus befähigt Fruktose periplasmatisch zu oxidieren und die Elektronen über die membranständige Cytochrom *c*-Untereinheit direkt an die Atmungskette zu überführen. Der schnellere Umsatz der Fruktose mit Hilfe des Enzymkomplexes könnte dem Organismus zum einen durch eine effizientere Energiekonservierung einen Wachstumsvorteil bei Wachstum mit Fruktose als Kohlenstoffquelle ermöglichen, zum anderen wäre *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* in der Lage den potentiellen Süßstoff 2-Keto-D-Fruktose zu produzieren.

In einem ersten Ansatz wurde die Effizienz der enzymatischen Umsetzung von D-Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose durch den Fruktose-Dehydrogenase-Komplex analysiert. Für diese Untersuchung wurde ein Wachstumsversuch mit Fruktose als einziger C-Quelle durchgeführt. *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* wurden in 100 ml YF-Medium mit einer Fruktose-Konzentration von 100 mM bei 30 °C kultiviert. Um das Wachstum der Stämme zu verfolgen, wurde alle 2 h die OD<sub>600</sub> bestimmt und Wachstumskurven erstellt. Die Wachstumskurve von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* wies keine eindeutige lag-Phase auf (Abb. 22 a). Das exponentielle Wachstum der Kultur erstreckte sich über einen Zeitraum von 20 h, bevor die Kultur eine finale OD<sub>600</sub> von 1,9 erreichte und in die stationäre Phase überging. Die Wachstumsrate lag bei 0,19 h<sup>-1</sup> und die Verdopplungszeit betrug 3,64 h. Während des Kultivierungszeitraumes konnte in der *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh*-Kultur eine Reduktion des pH Wertes von 6,5 auf 5 detektiert werden. (Abb. 22 b). Die Kultur des

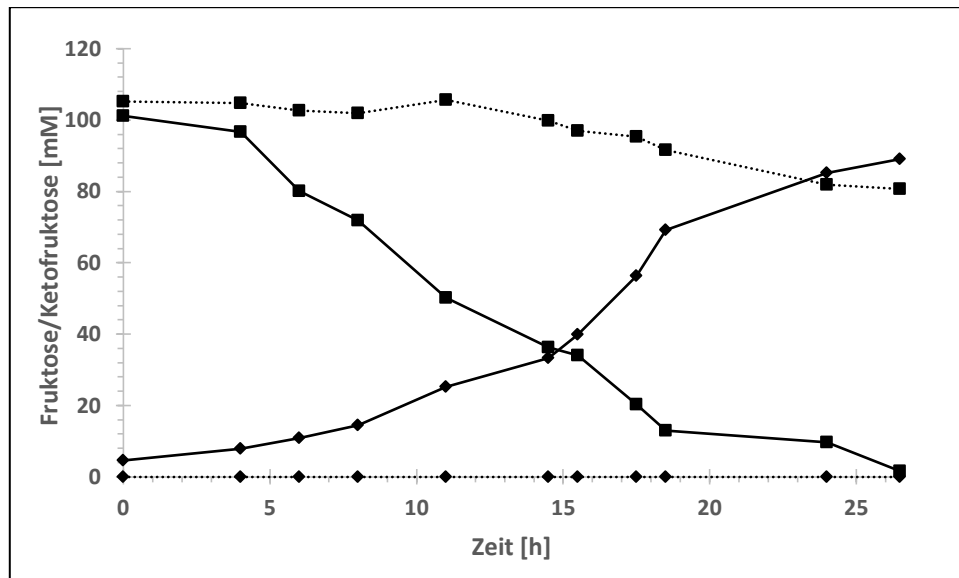
Kontrollstamms *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR wies einen klassischen exponentiellen Wachstumsverlauf mit einer Wachstumsrate von  $0,11 \text{ h}^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 6,36 h auf (Abb. 22 a). Die Kultur erreichte nach 55 Stunden eine finale  $\text{OD}_{600}$  von 0,9. Des Weiteren konnte eine Abnahme des pH-Werts von 6 auf 4,7 bestimmt werden (Abb. 22 b). Vergleicht man die Verdopplungszeiten sowie die End- $\text{OD}_{600}$ -Werte der beiden Stämme, so war ein deutlich schnelleres Wachstum von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* zu beobachten verglichen mit dem Kontrollstamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh*, der aufgrund des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes befähigt ist Fruktose an der cytoplasmatischen Membran zu oxidieren, einen Vorteil bei der Biomasseproduktion und der Energiekonservierung hat.



**Abbildung 22:** Wachstumskurven und pH-Wert-Verläufe der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR als Kontrollstamm (▲) und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh*, der die Gene für den Fdh-Komplex aus *G. japonicus* NBRC3260 besaß (●), mit 100 mM Fruktose als C-Quelle.

Die Probennahme zur Bestimmung der Produkt- und Substratkonzentrationen erfolgte alle 1,5 bis 2 h. Die Kulturüberstände wurden mittels HPLC über eine Aminex-HPX87H Säule aufgetrennt und analysiert. Da 5-Keto-D-Fruktose nicht käuflich erhältlich ist, wurde die Quantifizierung mit Hilfe eines 5-Keto-D-Fruktose-Standards durchgeführt, der von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bott (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt wurde. Die HPLC-Analysen zeigten, dass der Kontrollstamm innerhalb von 26,5 h 26 mM der ursprünglichen 105 mM Fruktose metabolisiert hat (Abb. 23). Die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose konnte nicht nachgewiesen werden. Für den Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* konnte ein kompletter Umsatz der Fruktose innerhalb von 26,5 h verzeichnet werden. Von den 101 mM Fruktose, die in der Kultur zu Beginn des Experiments enthalten war, wurden 89 mM zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert, was einer prozentualen Ausbeute von knapp 90 %

entsprach. Die übrigen 10 % der Fruktose wurden vom Organismus wahrscheinlich cytoplasmatisch umgesetzt und zur Biosynthese von Zellbestandteilen und für das Zellwachstum genutzt.



**Abbildung 23:** Fruktoseabbau und Ketofruktoseproduktion der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* als Kontrollstamm (gepunktete Linie) und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* (durchgehende Linie). Fruktose (■), Ketofruktose (◆). Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC. Eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

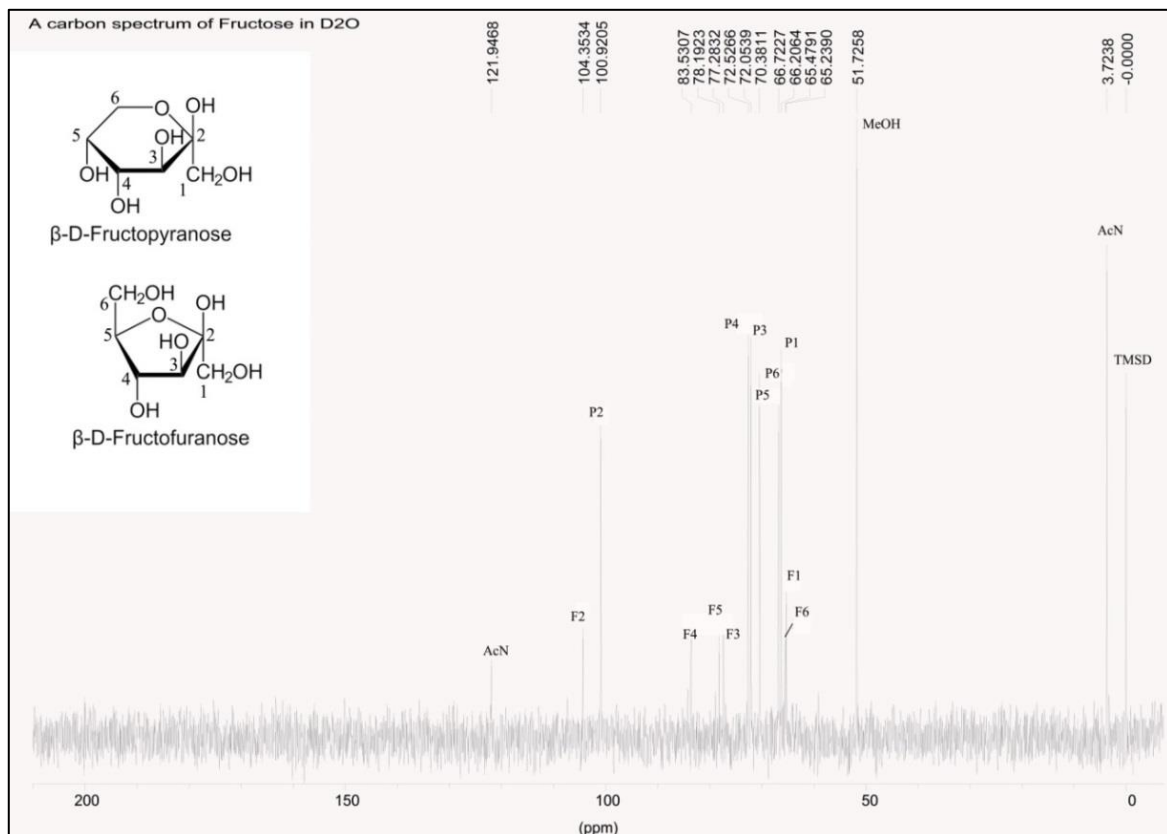
Acetat, ein Nebenprodukt, das bei der Verstoffwechslung von Fruktose entstehen kann, wurde nicht detektiert. Die Ergebnisse dieses Wachstumsversuches zeigen, dass Fruktose höchst effizient mit Hilfe des, in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produzierten, Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes, zu 5-Keto-D-Fruktose umgewandelt werden kann.

### 3.5.2 $^{13}\text{C}$ NMR-Spektroskopie zur Identifizierung der 5-Keto-D-Fruktose

Um zu verifizieren, dass es sich bei dem generierten Oxidationsprodukt der Fruktose um 5-Keto-D-Fruktose handelte, wurde ein  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von der im Wachstumsexperiment (Vgl. Kap. 3.5.1) gebildeten Substanz aufgezeichnet. Hierfür wurde der Überstand der Kultur *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* nach Beendigung des Wachstumsexperiments lyophilisiert und zur  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie an Herr Dr. Kehraus in das Institut der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn gegeben, zusammen mit einer Fruktoselösung als Negativkontrolle. Anschließend wurden die erhaltenen Spektren verglichen und analysiert. Fruktose liegt in wässriger Lösung in vier verschiedenen Formen vor. Die dominierende Form ist dabei  $\beta$ -Pyranose mit ca. 70 %, gefolgt von  $\beta$ -Furanose mit etwa 21 %. Die  $\alpha$ -Formen von Furanose und Pyranose treten in nur sehr geringer Konzentration auf (Barclay *et al.*, 2012; Funcke und Sonntag, 1978). Das  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum der Fruktoselösung zeigte, dass das



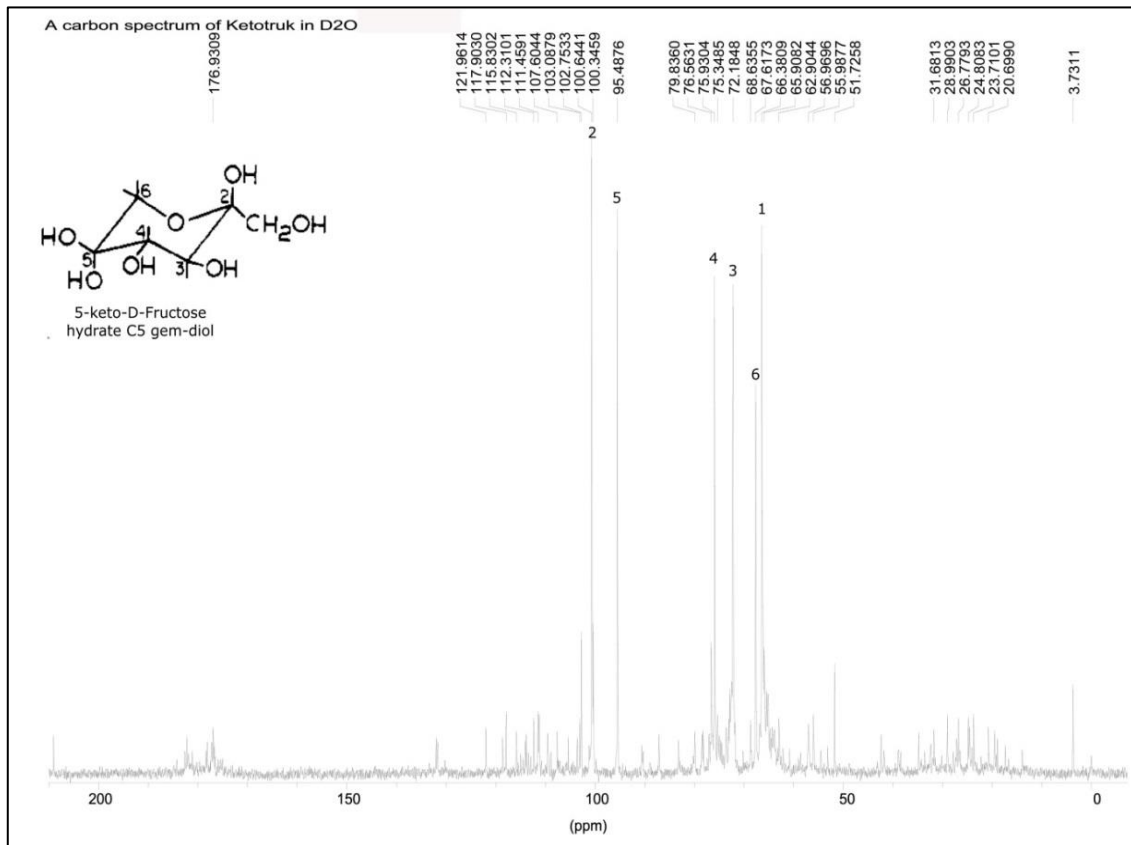
Molekül sowohl in der  $\beta$ -Form der Pyranose sowie in der Furanose in einem Verhältnis von ca. 3:1 vorlag (Abb. 24). Die Ziffern der Peaks entsprechen den durchnummerierten C-Atomen in der oberen linken Ecke der Abbildung, wobei P vor einer Ziffer für Pyranose und F für Furanose steht. Die mit den Ziffern 3 und 4 markierten Peaks sowie Peak P<sub>5</sub> der Pyranose konnte den C-Atomen zugeordnet werden, die eine H- und eine OH-Gruppe tragen und mit zwei weiteren C-Atomen in Bindung stehen.



**Abbildung 24:**  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von Fruktose. Aufgenommen wurde das Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$ . Fruktose liegt als Pyranose und Furanose in der  $\beta$ -Form vor. Die nummerierten Peaks entsprechen den C-Atomen der Fruktose. P=Pyranose; F=Furanose

Die Peaks mit der Ziffer 1 und der Peak F<sub>6</sub> der Furanose, spiegeln die C-Atome wider, die zwei H-Gruppen, sowie ein weiteres C-Atom und eine OH-Gruppe gebunden haben. Bei dem mit 2 bezifferten Peak handelt es sich um ein C-Atom, das eine Doppelbindung zu einem Sauerstoff aufweist. Über das  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum des lyophilisierten Kulturüberstandes konnte das gebildete Substrat eindeutig als 5-Keto-D-Fruktose identifiziert werden, die in einer  $\beta$ -Pyranoseform auftritt (Abb. 25). Bei den Peaks 1 und 6 handelt es sich um die C-Atome C<sub>1</sub> und C<sub>6</sub>, die als Methylen-C-Atome vorliegen, d.h. 2 H-Atome gebunden haben. Bei den C-Atomen C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> (Peak 3 und 4) handelt es sich um C-Atome mit einer Methinbindung, die 1 H gebunden haben. Die C-Atome C<sub>2</sub> und C<sub>5</sub> sind quartäre C-Atome, die

sich dadurch auszeichnen vier Substituenten gebunden zu haben, unter denen sich kein Wasserstoffatom befindet. Am C<sub>5</sub>-Atom konnte keine Ketogruppe detektiert werden, was darauf hindeutet, dass 5-Keto-D-Fruktose, wie auch von Blanchard *et al.* (1982) beschrieben, als Gem-Diol-Hydrat vorliegt.



**Abbildung 25:** <sup>13</sup>C NMR-Spektrum des Kulturüberstandes nach Wachstum des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR *fdh* mit 100 mM Fruktose als C-Quelle. Aufgenommen wurde das Spektrum in D<sub>2</sub>O. Die aufgezeichneten Peaks identifizieren das gebildete Produkt als 5-Keto-D-Fruktose. Die nummerierten Peaks entsprechen den nummerierten C-Atome der 5-Keto-Fruktose (oben links)

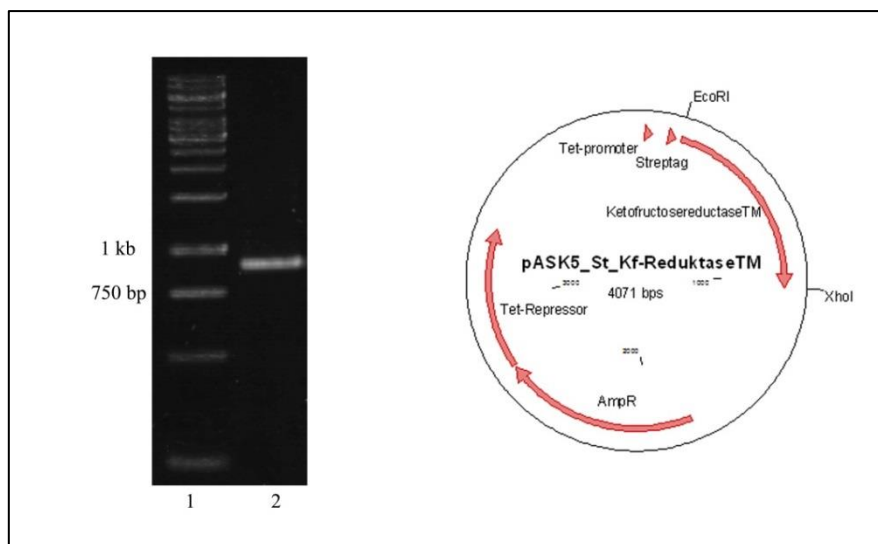
### 3.5.3 Keto-D-Fruktose-Reduktase – ein System zur Detektion von 5-Keto-D-Fruktose

Die Etablierung einer alternativen Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von 5-Keto-D-Fruktose war essentiell. Zwar kann 5-Keto-D-Fruktose mittels HPLC detektiert werden, die Detektionsgrenze lag jedoch bei ca. 3 mM, sodass geringe Konzentrationen an 5-Keto-D-Fruktose nicht nachgewiesen werden konnten. Deswegen wurde ein enzymatischer Ansatz entwickelt, basierend auf einer NADPH-abhängigen Ketofruktose-Reduktase aus *Tatumella (T.) morbirosei*, die 5-Keto-D-Fruktose zu Fruktose reduziert und NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert. Da die Extinktionsabnahme von NADPH bei 340 nm gemessen werden kann, wird über das Lambert Beer'sche Gesetz die Konzentration des oxidierten NADP berechnet. Pro reduziertem Molekül 5-Keto-D-Fruktose wird ein Molekül NADPH umgesetzt.

Die Konzentration von entstehendem NADP ist demnach äquivalent zu der Konzentration der 5-Keto-D-Fruktose im Versuchsansatz.

### 3.5.3.1 Klonierung und Expression der Ketofruktose-Reduktase

Durch nBlast-Analysen der bereits charakterisierten 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase aus *Erwinia citreus* (Schrimsher *et al.*, 1988), konnte im Rahmen dieser Arbeit ein homologes, als Shikimate-Dehydrogenase annotiertes, Gen in *T. morbirosei* identifiziert werden. Die Aminosäuresequenzen der Proteine, die von diesen Genen kodiert wurden, wiesen eine Identität von 80,6 % auf. Das für die putative Ketofruktose-Reduktase kodierende Gen wurde ausgehend von genomischer DNA von *T. morbirosei* amplifiziert.

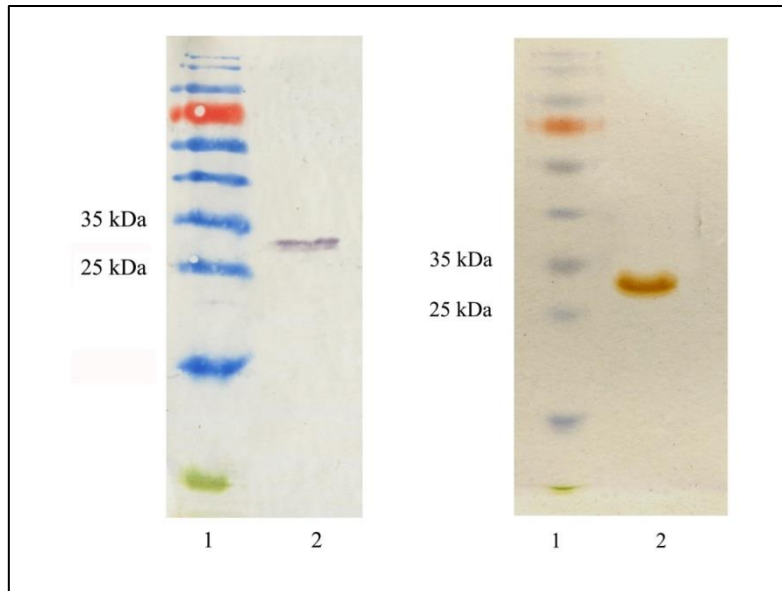


**Abbildung 26:** Klonierung des Expressionsplasmids pASK5\_St\_Kf-ReduktaseTM. Links: PCR zur Amplifizierung des, für die Ketofruktose-Reduktase kodierenden, Gens aus *T. morbirosei* (855 bp) Rechts: Erstelltes Plasmid pASK5\_St\_Kf-ReduktaseTM zu Produktion der Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei*. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen, Streptag: N-terminaler Streptag II, Tet-Promotor: durch AHT-induzierbarer Promotor. Das Gen wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pASK5 eingebracht.

Das PCR-Fragment mit der erwarteten Größe von 855 bp wurde aufgereinigt und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pASK5 kloniert (Abb. 26). Der Vektor enthält die Sequenz für einen N-terminalen Strep-Tag zur chromatographischen Aufreinigung des Proteins und die Expression des Gens von Interesse steht unter der Kontrolle des Tet-Repressor-Systems, das durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) induziert wird. Das Plasmid wurde *E. coli* NEB 5 alpha transformiert und vervielfältigt. Die Proteinproduktion erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3).

Hierfür wurde eine Kultur in 200 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen und dann mit AHT induziert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für

4 h bei 30 °C. Dann wurde die Kultur geerntet, mittels Ultraschall aufgeschlossen und aus dem Zelllysat die putative 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase über den fusionierten Strep-Tag II aufgereinigt. Aus 200 ml Kultur konnten 3,2 mg Protein gewonnen werden. Der anschließend durchgeführte Western Blot zeigte eine Proteinbande bei 32 kDa, die der erwarteten Größe der putativen 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase von 32,3 kDa entsprach (Abb. 27). Die Silberfärbung des Enzyms zeigte ebenfalls eine einzelne Bande von 32 kDa und bestätigte, dass keine Verunreinigungen durch andere Proteine vorlagen.

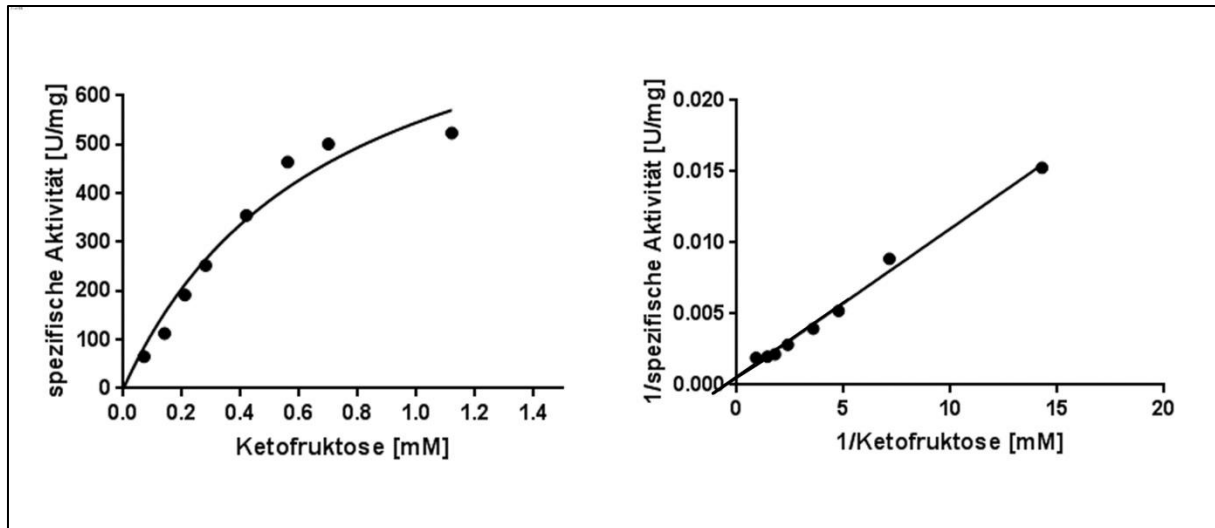


**Abbildung 27:** Silberfärbung und Western Blot der aufgereinigten Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei*, heterolog produziert in *E. coli* BL21 (DE3). 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 2: Aufgereinigte Ketofruktose-Reduktase

### 3.5.3.2 Bestimmung des Substratspektrums der putativen 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase

Um das Substratspektrum und die Spezifität der putativen 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase zu ermitteln, wurde ein Substratscreening durchgeführt. Die photometrischen Enzymtests wurden bei Raumtemperatur in Kaliumphosphat-Puffer (KPB) durchgeführt. Als Elektronendonator wurde NADPH eingesetzt. Als Substrate wurden verschiedene Ketozucker, Zucker, Zuckerderivate, Aldehyde, Ketone, Ketocarbone, sowie 2-Ketoglukonat, Shikimat und Pyruvat getestet (s. Anhang 3). Das Enzym zeigte ausschließlich mit 5-Keto-D-Fruktose eine Aktivität. Da aus *Gluconobacter cerinus* und *Erwinia citreus* isolierte, charakterisierte Ketofruktose-Reduktasen neben der Reduktion von 5-Keto-D-Fruktose, die Oxidation von Arabinose, Fruktose, Sorbose und Mannose katalysierten, wurde mit dem Enzym aus *T. morbirosei* ebenfalls Aktivitätstests mit NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor und den genannten Zuckern durchgeführt. Die Fähigkeit bestimmte

Zucker zu oxidieren konnte jedoch nicht beobachtet werden. Somit konnte das Enzym aus *T. morbirosei* eindeutig als Ketofruktose-Reduktase mit großer Substratspezifität identifiziert werden. Anschließend wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik aufgezeichnet und ein Lineweaver-Burk-Plot erstellt, um den  $K_M$ -Wert des Enzyms für 5-Keto-D-Fruktose zu bestimmen. Die Auswertung und die Erstellung der linearen Regression erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, setzte eine Sättigung des Enzyms bei 1 mM 5-Keto-D-Fruktose ein.



**Abbildung 28:** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei* von der Substratkonzentration. Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KPb (pH 7) bei 30 °C durchgeführt. Als Elektronendonator wurde NADPH und als Substrat wurde Ketofruktose eingesetzt. Links: Michaelis-Menten-Auftragung. Rechts: Lineweaver-Burk-Auftragung.

Die errechnete maximale spezifische Aktivität ( $V_{max}$ ) lag bei  $777,2 \pm 8,2$  U/mg und der  $K_M$ -Wert für 5-Keto-D-Fruktose wurde auf  $0,71 \pm 0,07$  mM bestimmt. Somit besitzt die 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase aus *T. morbirosei* nicht nur eine hohe Spezifität, sondern auch eine sehr hohe Affinität gegenüber 5-Keto-D-Fruktose, sodass dieser Enzymaktivitätstest sich auch für die Quantifizierung niedriger 5-Keto-D-Fruktose-Konzentrationen eignet.

### 3.5.3.3 Detektion von Ketofruktose in Lebensmitteln mittels Ketofruktose-Reduktase

Durch die Entwicklung des höchst sensitiven Nachweisverfahrens von 5-Keto-D-Fruktose, basierend auf der Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei*, konnte das Auftreten von 5-Keto-D-Fruktose in Lebensmitteln im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Hierfür wurden verschiedene Lebensmittel mit  $H_2O$  verdünnt und als Substrat in Enzymaktivitätstest eingesetzt (vgl. Kap. 2.4.8.3 und Kap. 3.5.3.2). Insgesamt konnte 5-Keto-D-Fruktose in drei von sechs getesteten Lebensmitteln nachgewiesen werden (Tabelle 12). In Obstblüten- und Waldblütenhonig konnten Konzentrationen von 13  $\mu M$  und 5,6  $\mu M$  5-Keto-D-Fruktose

detektiert werden und die 5-Keto-D-Fruktose-Konzentration in Holunderblütensirup lag bei 15  $\mu\text{M}$ . Auf diese Weise konnte bestätigt werden, dass 5-Keto-D-Fruktose natürlich in

**Tabelle 12:** Vorkommen von 5-Keto-D-Fruktose in Lebensmitteln

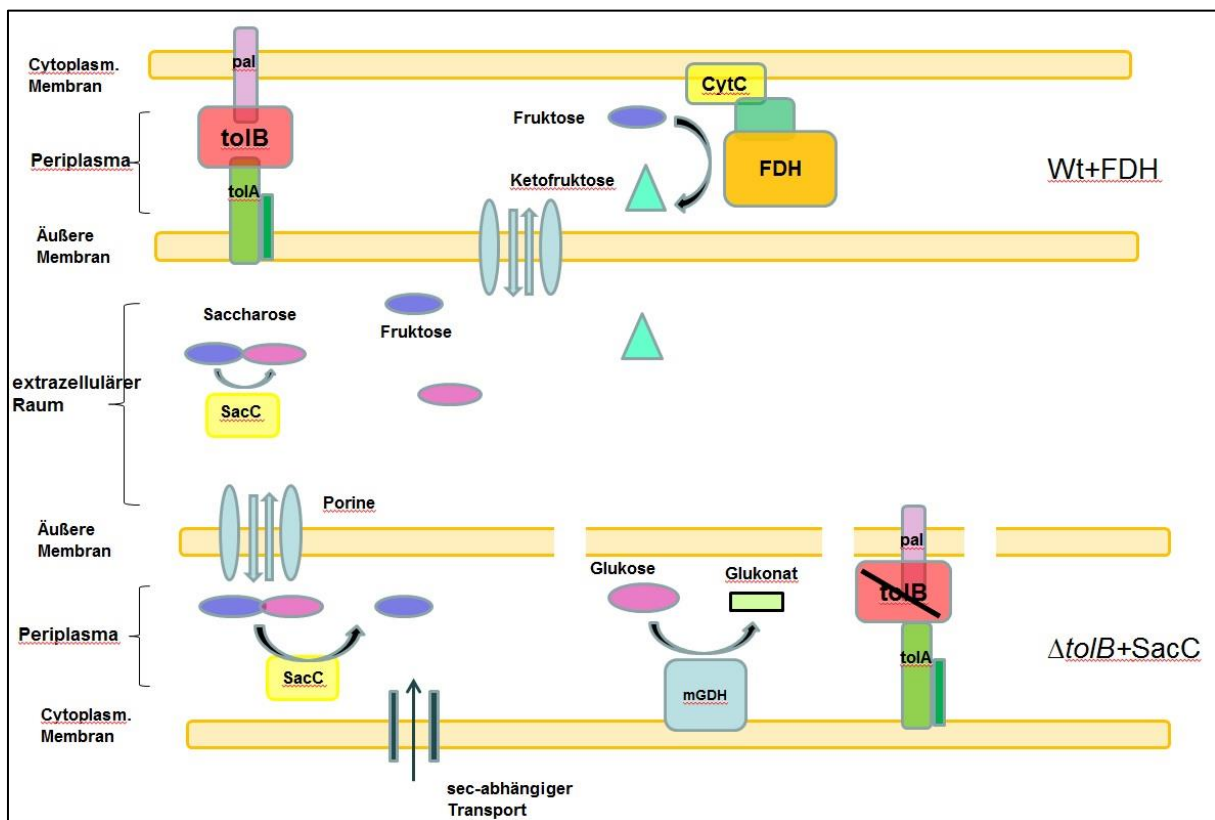
<b>Substrat</b>	<b>Ketofruktose [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
Obstblütenhonig	13 $\pm$ 0,03
Waldwiesenhonig	5,6 $\pm$ 0,01
Apfelwein	0
Kokosblütenzucker	0
Holunderblütensirup	15 $\pm$ 0,01
Pflaumenmus	0

Lebensmitteln enthalten ist. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass mit Hilfe der neu entwickelten Quantifizierungsmethode 5-Keto-D-Fruktose in sehr geringen Konzentrationen im mikromolaren Bereich nachgewiesen werden kann, wohingegen die Detektionsgrenze der HPLC im millimolaren Bereich liegt.

#### **3.5.4 Die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus dem Disaccharid Saccharose**

Die Experimente, die in Kapitel 3.5.1 dieser Arbeit dargestellt sind, zeigten, dass die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Fruktose mit Hilfe des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* sehr effizient durchgeführt werden kann. Die Nutzung von Fruktose als Substrat zur Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose ist aufgrund ihres Einkaufspreises mit hohen Kosten verbunden. Die Erschließung eines alternativen, kostengünstigeren Substrates war somit von großem Interesse, um die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose im industriellen Maßstab möglich zu machen. Di- und Polysaccharide wie Saccharose, Cellulose, oder Hemicellulose bieten zwar in aufgereinigter Form keinen großen preislichen Vorteil verglichen mit Monosacchariden, liegen jedoch in hohen Konzentrationen in pflanzlichen Rohstoffen vor. So bestehen beispielsweise beim Erntezeitpunkt bis zu 25 % des Feuchtgewichts der Zuckerrübe aus dem Disaccharid Saccharose (Wyse, 1979; Schiweck, 1983). Im Hinblick auf die immer größer werdende Bedeutung der Verwertung von Rohstoffen und pflanzlichen „Abfallstoffen“ ist die Produktion eines Süßstoffes aus pflanzlichen Materialien von großem Interesse. *G. oxydans* ist in der Lage Disaccharide über Porine in der äußeren Membran ins Periplasma aufzunehmen. Der Organismus kann diese Disaccharide jedoch nicht hydrolysieren, da für Hydrolasen kodierende Gene im Genom nicht vorhanden sind. Somit sollte im ersten Schritt, die Generierung eines *G. oxydans*-Stammes erfolgen, der das Disaccharid Saccharose, aufnehmen und in die Monosaccharide Glukose

und Fruktose spalten kann (Kosciow, 2017). Als Basis diente eine Deletionsmutante von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR, bei der das Gen *gox1687*, das für das Protein TolB codiert, deletiert wurde (Kosciow *et al.*, 2016). TolB ist Teil des TolPal-Komplexes, der für die Integrität und Stabilität der äußeren Membran verantwortlich ist. Die Deletion dieses Gens resultierte in einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Membran, sodass Enzyme, die im periplasmatischen Raum agieren, in den extrazellulären Raum gelangen konnten (Kosciow *et al.* 2014). Zusätzlich konnten Substrate wie Disaccharide besser ins Periplasma diffundieren. Durch die anschließende Produktion der extrazellulären Sucrase SacC aus *Zymomonas* (*Z.*) *mobilis* in der  $\Delta$ 1687-Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR  $\Delta$ 1687 *sacC* war der Stamm in der Lage mit Saccharose als einziger C-Quelle zu wachsen (Kosciow, 2017).



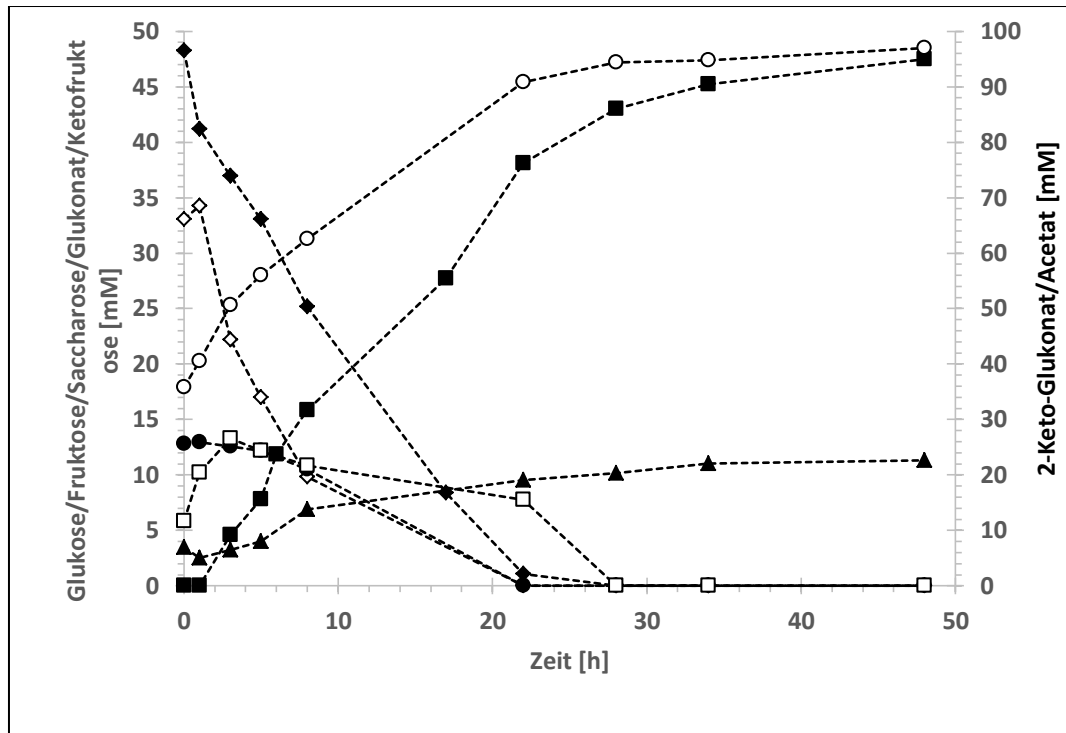
**Abbildung 29:** Systematische Darstellung des 2-Stamm-Systems zur Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose aus Saccharose. Der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR  $\Delta$ 1687 *sacC* ( $\Delta$ tolB + SacC), der das für die extrazelluläre Sucrase SacC kodierende Gen aus *Z. mobilis* besitzt, spaltet Saccharose in Glukose und Fruktose. Aufgrund der durchlässigen äußeren Membran des Stammes basierend auf der Deletion des *tolB*-Gens, kann die Sucrase, die die Spaltung der Saccharose katalysiert, im extrazellulären und im periplasmatischen Raum aktiv sein. Die entstehende Glukose kann von beiden *G. oxydans*-Stämmen metabolisiert werden. Die aus der Spaltung der Saccharose entstandene Fruktose kann von dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR *fdh* (Wt + Fdh), der die für den Fruktose-Dehydrogenase (Fdh)-Komplex aus *G. japonicus* NBRC3260 kodierende Gene besitzt, aufgenommen und vom Fdh-Komplex zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert werden. 5-Keto-D-Fruktose wird ins Medium abgegeben.

Die produzierte Sucrase SacC konnte, aufgrund der durchlässigen äußeren Membran, im Periplasma vorhandene sowie im extrazellulären Raum vorhandene, Saccharose hydrolytisch spalten. Basierend auf dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 sacC, der Saccharose in Glukose und Fruktose spaltet und dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR fdh, der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose oxidieren kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein 2-Stamm-System entwickelt, mit dem aus Saccharose 5-Keto-D-Fruktose gewonnen werden kann. Schematisch ist das System in Abbildung 29 dargestellt. Die Saccharose wird von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 sacC hydrolysiert. Dies geschieht extrazellulär und periplasmatisch. Die entstandene Glukose kann anschließend von den zwei Stämmen verstoffwechselt werden, entweder durch Oxidation mittels der membranständigen Glukose- Dehydrogenase Gox0265, oder cytoplasmatisch über den Pentosephosphat- oder Entner-Doudoroff-Weg. Die durch die Hydrolyse entstandene Fruktose, die sich im extrazellulären Raum befindet, kann dann vom Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR fdh aufgenommen und zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt werden. Da Glukose gegenüber Fruktose als Substrat von *G. oxydans* favorisiert wird, wird diese vornehmlich zur Energiekonservierung genutzt.

Um die Effizienz des 2-Stamm-Systems zu untersuchen, wurden die beiden Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 sacC und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR fdh separat in YM- oder YMG-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 herangezogen und dann im Verhältnis 1:1 zusammengegeben. Anschließend wurden 50 mM Saccharose, 10 mM Glukose, sowie 60 mM KPB pH 6,8 zu der Mischkultur hinzugefügt. Über einen Zeitraum von 48 h wurden regelmäßig Proben aus dem Kulturüberstand entnommen, abzentrifugiert und filtriert, und für HPLC-Analysen verwendet. Zu Beginn des Experiments konnten Glukose, Fruktose, Glukonat und 2-Ketoglukonat nachgewiesen werden. Die anfangs nachgewiesenen Verbindungen Fruktose (5,9 mM), Glukose (23 mM), 2-Ketoglukonat (36 mM) und Glukonat (13 mM) waren Substratreste und Produkte, die aus der Kultivierung der Vorkulturen stammten. Die Vorkulturen wurden in YMG- (*G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 sacC) und YM-Medium (*G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR fdh) angezogen, wobei die Glukose des YMG-Mediums über Glukonat zu 2-Ketoglukonat umgesetzt wird. Glukonat kann dabei als Zwischenprodukt im Medium akkumulieren. Die, den Stämmen zur Verfügung stehenden, Substrate zu Beginn des Versuchs waren somit Saccharose, Glukose, Fruktose und Glukonat. Im Laufe des Experiments sank der pH über den Inkubationszeitraum von 48 von 5,5 auf 3,8 ab. Die maximale End-OD<sub>600</sub> der Mischkultur lag bei 1,7. Die HPLC-Analysen zeigten, dass die Saccharose über einen Zeitraum von 22 h komplett abgebaut wurde (Abb. 30). Die Abnahme der Saccharose-Konzentration verlief dabei exponentiell. Das anfänglich in der



Kultur enthaltenen 13 mM Glukonat wurden innerhalb von 22 Stunden vollständig umgesetzt und wahrscheinlich zu 2-Ketoglukonat oxidiert. Insgesamt 81 mM Glukose (33 mM aus der Vorkultur, 48 mM Saccharose-Äquivalente, 10 mM Substrat) wurden von der Mischkultur metabolisiert und entweder zu 2-Keto-Glukonat oxidiert, oder cytoplasmatisch zu Acetat umgesetzt. Als Produkte wurden neben der gewünschten 5-Keto-D-Fruktose außerdem Acetat und 2-Ketoglukonat gebildet. Die Konzentration von 2-Ketoglukonat stieg über einen Zeitraum von 28 h stetig an und erreichte nach 48 h eine Konzentration von 97 mM.



**Abbildung 30:** Substrat- und Produktspektrum des 2-Stamm-Systems bei der Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose aus Saccharose. Die Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 *sacC* wurden mit 50 mM Saccharose als C-Quelle kultiviert und der Kulturüberstand mittels HPLC analysiert. Glukose (◇), Saccharose (◆), Ketofruktose (■), Acetat (▲), Fruktose (□), Glukonat (●) und 2-Ketoglukonat (○). Eines von vier unabhängigen Experimenten wird gezeigt.

Die Acetat-Konzentration erreichte einen finalen Wert von 22 mM. Die Bildung der 5-Keto-D-Fruktose erfolgte über einen Zeitraum von 48 h, in dem aus 53,9 mM Fruktose (5,9 mM aus der Vorkultur und 48 mM Saccharose-Äquivalente) 49 mM 5-Keto-D-Fruktose gebildet wurde, was einer Ausbeute von 91 % entspricht. Somit zeigte das entwickelte 2-Stämme-System eine äußerst hohe Effizienz im Umsatz von Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose.

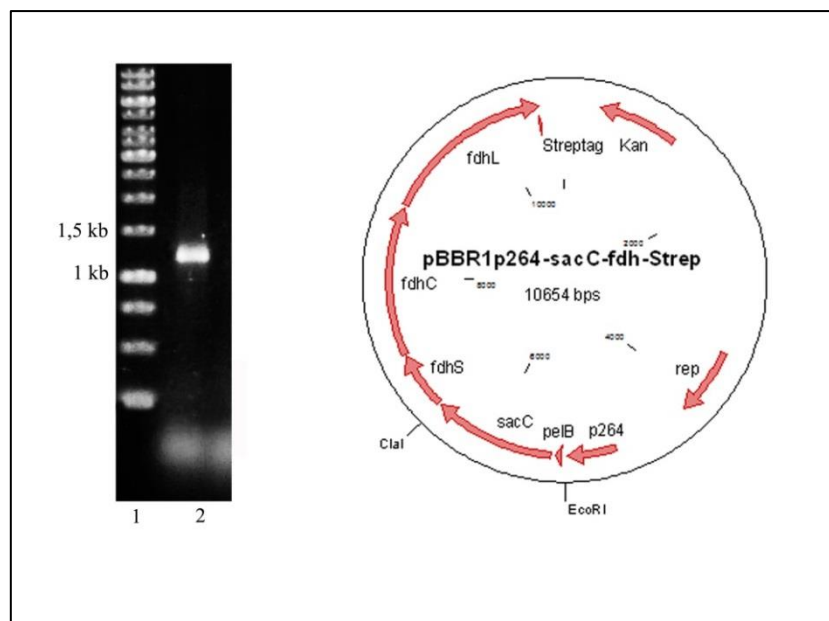
### 3.5.5 Die Umsetzung von Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose in einem Stamm

Um die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Saccharose zu vereinfachen, sollte die Expression des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes und der extrazellulären Sucrase SacC in

einem Stamm erfolgen. Hierzu wurden verschiedene Klonierungsstrategien entworfen, um *sacC* und die *fdh*-Gene in einem Plasmid zu vereinen und eine Co-Expression zu ermöglichen.

### 3.5.5.1 Klonierung und Expression des Plasmids pBBR1p264-*sacC*-*fdh*-Strep

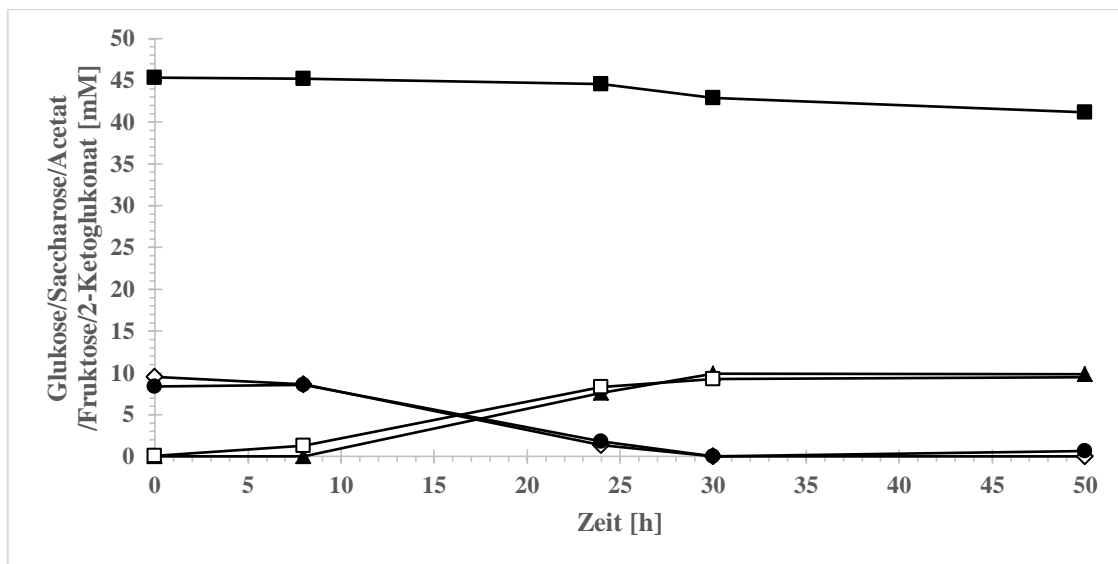
Das Gen *sacC* wurde, mit dem vorangehenden *pelB*-Signalpeptid, von dem Plasmid pBBR1p264*pelB*-*SacC*-SI (Kosciow, 2017) amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das 1,3 kb DNA-Fragment wurde aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Cla*I und *Eco*RI verdaut, ebenso wie das Plasmid pBBR1p264-*fdh*-Strep, welches als Vektorgerüst diente (Abb. 31).



**Abbildung 31:** Klonierung des Expressionsplasmids pBBR1p264-*sacC*-*fdh*-Strep zur Co-Produktion der Sucrase *SacC* und des Fdh-Komplexes. Links: PCR zur Amplifizierung des Gens *SacC* zusammen mit dem, auf dem Plasmid pBBR1p264*pelB*-*SacC*-SI kodierten, *pelB*-Signalpeptids. 1: 1kb DNA-Marker (Thermo Scientific), 2: PCR-Produkt des Gens *sacC* mit *pelB*-Signalpeptid. Rechts: Erstelltes Expressionsplasmid pBBR1p264-*sacC*-*fdh*-Strep. Das, für die extrazelluläre Sucrase kodierende, Gen *sacC*, sowie die Gene, die für die Untereinheiten des Fdh-Komplexes kodieren (*fdhS*, *fdhC* und *fdhL*), stehen unter der Kontrolle eines Promotors (*p264*). *Kan*: Kanamycin-Resistenzkassette, *mob*: Mobilisierungsgen, *rep*: Replikationsursprung; *p264*: Promotorregion; *Streptag*: Strep-Tag II.

Nach Inkubation des Vektors mit alkalischer Phosphatase erfolgte die Ligation des *sacC*-Gens mit dem Vektorgerüst. Das entstandene Plasmid pBBR1p264-*fdh*-*pelB**sacC*-SI wurde in *E. coli* NEB 5 alpha transformiert und repliziert. Anschließend wurde das Plasmid mittels Elektroporation in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* eingebracht und es wurden Wachstumsexperimente durchgeführt. Hierfür wurde eine Vorkultur in YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,2 angezogen, die dann in 100 ml YGS-Medium (10 mM Glukose, 50 mM Saccharose)

überimpft wurde, sodass die Start-OD<sub>600</sub> bei 0,05 lag. Die Zugabe von Glukose sollte einer C-Quellenlimitierung zu Beginn des Experiments vorbeugen. Als Puffer wurde 100 mM KPB pH 6,8 hinzugegeben. Über einen Zeitraum von 50 h wurden Proben des Kulturüberstandes genommen und mittels HPLC analysiert. Die Kultur wuchs bis zu einer finalen OD<sub>600</sub> von 0,5, die nach 30 h erreicht wurde. Die Wachstumsrate lag bei 0,25 h<sup>-1</sup> und die Verdopplungszeit betrug 2,8 h. Der pH-Wert blieb über den gesamten Zeitraum des Experiments weitgehend stabil und sank lediglich von 6,9 auf 6,5. Die HPLC-Analysen zeigten, dass Saccharose nach 40 h weiterhin mit einer Konzentration von 41,2 mM vorlag (Abb. 32).



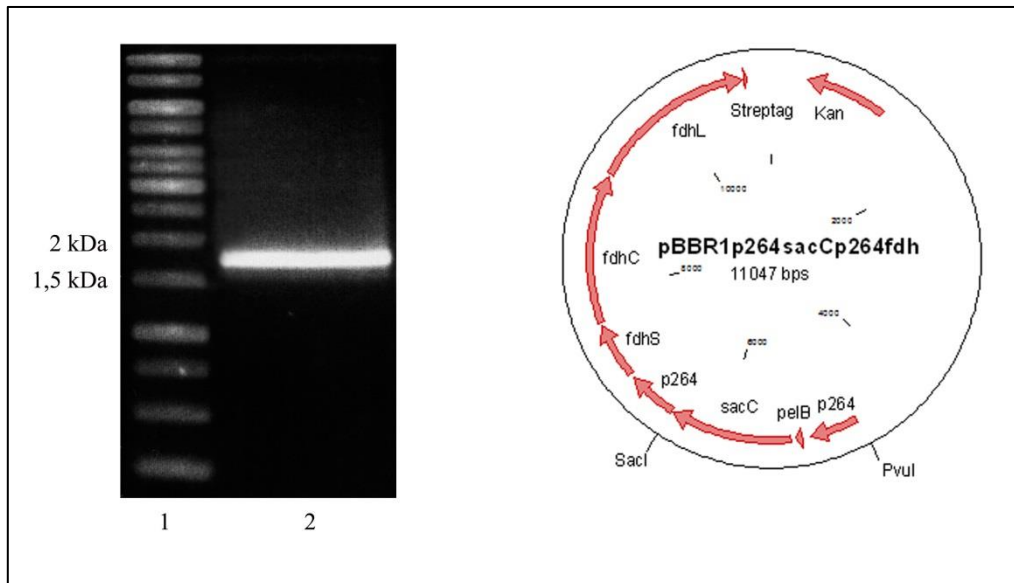
**Abbildung 32:** Substratumsetzung des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 mit dem Plasmid pBBR1p264-SacC-Fdh-Strep mit 50 mM Saccharose und 10 mM Glukose als C-Quellen. Glukose ( $\diamond$ ), Saccharose ( $\blacksquare$ ), Acetat ( $\blacktriangle$ ), Fruktose ( $\bullet$ ) und 2-Ketoglukonat ( $\square$ ).

Damit wurden lediglich 4 mM Saccharose abgebaut. Die Metabolisierung der Glukose, die eine anfängliche Konzentration von 9,5 mM aufwies, setzte nach 8 h ein. Nach weiteren 12 h konnte keine weitere Glukose im Kulturüberstand detektiert werden. Ähnlich verhielt es sich mit der Fruktose, die aus der Vorkultur stammte und zu Beginn des Experiments in einer Konzentration von 8,4 mM vorlag. Die Fruktose-Konzentration begann ebenfalls nach 8 h abzunehmen und war nach 30 h nicht mehr detektierbar. Als gebildete Produkte konnten Acetat und 2-Ketoglukonat nachgewiesen werden. Die Bildung von Acetat setzte nach 8 h ein und erreichte nach 30 h eine Konzentration von 9,8 mM. Die Akkumulierung des 2-Ketoglukonats erfolgte hauptsächlich in der Zeitspanne zwischen 8 h und 30 h. Bei Beendigung des Experiments konnte eine 2-Ketoglukonat-Konzentration von 9,2 mM gemessen werden. Die Bildung von 5-Keto-D-Fruktose konnte nicht verzeichnet werden. Da weder Saccharose abgebaut, noch 5-Keto-D-Fruktose gebildet wurde, schien die Co-

Produktion der Sucrase SacC und des 5-Keto-D-Fruktose-Dehydrogenasen-Komplexes nicht stattgefunden zu haben. Die leichte Abnahme der Saccharose-Konzentration ist auf eine minimale Umsetzung des Disaccharids durch den Organismus zurückzuführen. Frühere Studien wiesen darauf hin, dass *G. oxydans* 621H in der Lage ist Saccharose in kleinen Mengen metabolisch umzusetzen, jedoch das Disaccharid nicht als einzige C-Quelle zum Wachstum nutzen kann (Kosciow, 2017). Ein möglicher Grund für die nicht oder zu schwach erfolgte Genexpression, könnte die Promotorsituation im Plasmid gewesen sein, bei der sowohl die Gene des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes, als auch *sacC* hinter einem gemeinsamen Promotor kloniert vorlagen. Da es sich bei dem *p264*-Promotor um einen starken Promotor handelt, sollte die Expression mehrerer Gene unter einem Promotor möglich sein. Dennoch könnte das Einbringen einer weiteren *p264*-Promotorregion zwischen den *fdh*-Genen und dem für die Sucrase SacC kodierenden Gen zu einer Steigerung der Expression führen. Zu diesem Zweck wurden alternative Expressionsplasmide erstellt, die eine zusätzliche Promotorregion besaßen, sodass die *fdh*-Gene und das Gen *sacC* unter der Kontrolle eigener Promotoren standen und eine Expression der Gene unabhängig voneinander erfolgen konnte.

### **3.5.5.2 Klonierung des Plasmids pBBR1p264sacC-264fdh und Versuche zur Co-Produktion von SacC und dem Fdh-Komplex**

Um eine zusätzliche Promotorregion in das Expressionssystem einzubringen wurde das Gen *sacC* mitsamt dem davorliegenden Promotor *p264* sowie dem *pelB*-Signalpeptid mit den Primern *p264\_sacC\_fw* und *p264\_sacC\_rev* amplifiziert. Als Template diente das Plasmid *pBBR1p264-SPpelB-sacC-St* (Kosciow, 2017). Das PCR-Fragment wies die erwartete Größe von 1,8 kb auf und wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 33). Anschließend wurde das DNA-Fragment sowie der Vektor *pBBR1p264-fdh-St* mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *PvuI* verdaut. Nach zusätzlicher Inkubation des Vektorgerüsts mit alkalischer Phosphatase erfolgte die Ligation von Insert und Vektor. Das entstandene Plasmid *pBBR1p264sacCp264fdh* wurde in *E. coli* NEB 5 alpha transformiert und repliziert. Nach erfolgter Elektroporation des Plasmids *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR*  $\Delta$ *I687* wurde wie unter 3.5.5.1 beschrieben ein Wachstumsversuch mit 50 mM Saccharose und 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle durchgeführt.

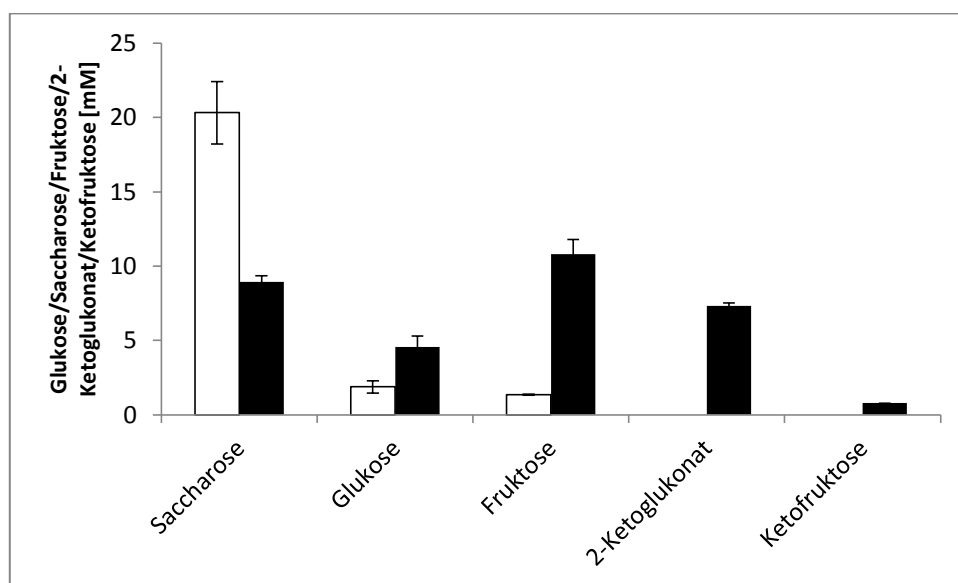


**Abbildung 33:** Klonierung des Expressionsplasmids pBBR1p264sacCp264fdh zur Co-Produktion der Sucrase SacC und des Fdh-Komplexes. Links: PCR zur Amplifizierung des Gens *SacC* zusammen mit der Nukleotidsequenz des, auf dem Plasmid pBBR1p264pelB-SacC-SI kodierten, pelB-Signalpeptids und des Promotors *p264*. 1: 1kb DNA-Marker (Thermo Scientific), 2: PCR-Produkt des Gens *sacC* mit pelB-Signalpeptid und *p264*-Promotorregion. Rechts: Erstelltes Expressionsplasmid pBBR1p264sacCp264fdh. Durch das Einfügen einer zweiten Promotorregion, stehen das Gen *sacC* sowie die Gene des Fdh-Komplexes (*fdhS*, *fdhC* und *fdhL*) unter der Kontrolle eines jeweils eigenen Promotors (*p264*). Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion; Streptag: Strep-Tag II.

Die Saccharosekonzentration fiel über einen Zeitraum von 48 h von 47,4 mM auf 45 mM. Von der anfänglichen Glukosekonzentration von 11,5 mM wurden 8,2 mM verstoffwechselt, sodass die Glukosekonzentration nach Beendigung des Experiments bei 3,3 mM lag. Die, durch die Vorkultur übertragene, Fruktose, die zu Beginn in einer Konzentration von 7,9 mM vorlag, wurde nicht umgesetzt. Als Produkt wurde lediglich 2-Ketoglukonat detektiert in einer finalen Konzentration von 7,4 mM. Die Kultur erreichte nach 54 h eine finale OD<sub>600</sub> von 0,27 und der pH-Wert sank in diesem Zeitraum von 6,2 auf 5,1 ab. Die erhobenen Daten spiegeln somit die zuvor beschriebenen Ergebnisse des Wachstumsversuchs mit *G. oxydans* Δ1687 und dem Plasmid pBBR1p264-pelBsaC-fdh-St wieder, bei dem die Gene des Fdh-Komplexes zusammen mit dem für die Sucrase kodierenden Gen *sacC* unter der Kontrolle eines Promotors standen (Vgl. Kap. 3.5.5.1).

Als nächsten Schritt galt es zu ermitteln, ob beide Proteineinheiten, SacC und Fdh-Komplex, nicht gebildet wurden, oder, ob die nicht erfolgte Bildung von 5-Keto-D-Fruktose lediglich auf die Inaktivität von SacC zurückzuführen war. Sollte nur SacC nicht gebildet werden, würde die Spaltung der Saccharose in Glukose und Fruktose nicht erfolgen und demnach kein Substrat für die Fruktose-Dehydrogenase zur Verfügung stehen. Um diese Hypothese zu

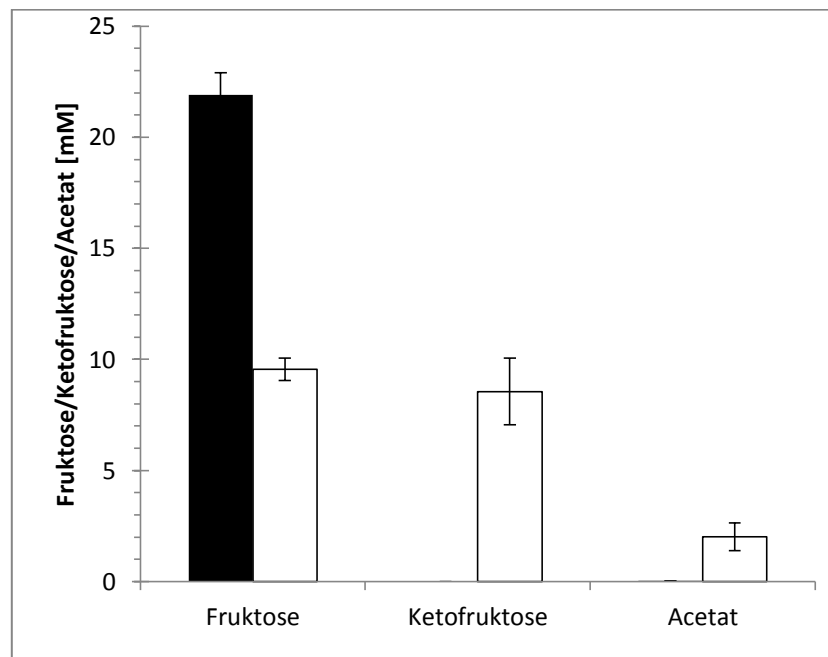
überprüfen, wurden Versuche mit ruhenden Zellen durchgeführt. Dafür wurde eine 100 ml-Kultur von *G. oxydans* 621H $\Delta$ hdsR  $\Delta$ 1687 pBBR1p264sacCp264fdh-in YM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,9 inkubiert. Nach einmaligen Waschen der Zellen mit 1 mM Tris-HCl pH 7, wurde das Pellet in 100 ml des gleichen Puffers resuspendiert und in zwei Schikane-Kolben überführt. Als Substrat wurde zu einer der Zellsuspensionen 20 mM Saccharose und zu der anderen 20 mM Fruktose hinzugegeben. Die Zellsuspensionen wurden für 24 h inkubiert und zu Beginn und nach Abschluss des Experiments Proben gezogen. Die Proben wurden abzentrifugiert und filtriert und dann mittels HPLC und 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase-Test analysiert.



**Abbildung 34:** Umsatz von Saccharose durch ruhende Zellen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR  $\Delta$ 1687 mit dem Plasmid pBBR1p264sacCp264fdh. Die ruhenden Zellen wurden für 24 h in 1 mM Tris-HCl (pH 7) und 20 mM Saccharose inkubiert. Der Überstand der Zellsuspension wurde mittels HPLC und Ketofruktose-Reduktase-Test analysiert. Dargestellt sind die, im Überstand der Kultur gemessenen, Substanzen zum Zeitpunkt 0 h (weiße Balken) und nach 24 stündiger Inkubation (schwarze Balken). Die Daten bilden den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die HPLC-Ergebnisse der ruhenden Zellen, die Saccharose als Substrat zur Verfügung hatten, zeigten, dass die Hälfte der Saccharose abgebaut wurde. Von  $20,3 \pm 2,1$  mM Saccharose, die zu Beginn des Experiments detektiert werden konnten, waren nach 24 h noch  $8,9 \pm 0,4$  mM im Überstand zu finden (Abb. 34). Zum Zeitpunkt 0 h konnten neben der Saccharose auch geringe Mengen von Fruktose und Glukose gemessen werden, die bei  $1,9 \pm 0,4$  mM (Glukose) und  $1,4 \pm 0,03$  mM (Fruktose) lagen. Diese Glukose- und Fruktose-Rückstände sind vermutlich auf Kontaminationen durch Monosaccharide in der Saccharose zurückzuführen. Sowohl die Glukose- als auch die Fruktose-Konzentration nahmen im Laufe

des Inkubationszeitraums zu und erreichten Endwerte von  $4,6 \pm 0,7$  mM und  $10,8 \pm 1$  mM. Des Weiteren konnte die Bildung von 2-Ketoglukonat nachgewiesen werden, welches nach 24 h eine Konzentration von  $7,3 \pm 0,2$  mM erreichte. 5-Keto-D-Fruktose war mittels HPLC nicht messbar, jedoch konnte mit Hilfe des 5-Keto-D-Fruktose-Reduktase-Enzymaktivitätstest die Bildung von  $0,8 \pm 0,002$  mM 5-Keto-D-Fruktose detektiert werden. Dass ein deutlicher Abbau der Saccharose zu beobachten war, zeigte dass die extrazelluläre Sucrase SacC aktiv produziert wurde. Die HPLC-Daten der ruhenden Zellen mit Fruktose als Substrat legten dar, dass innerhalb von 24 h 12,4 mM der anfänglichen  $21,9 \pm 1$  mM Fruktose metabolisiert wurden (Abb. 35). Als Produkte konnten 5-Keto-D-Fruktose, in einer Konzentration von  $8,6 \pm 1,5$  mM, sowie  $2 \pm 0,6$  mM Acetat nachgewiesen werden.



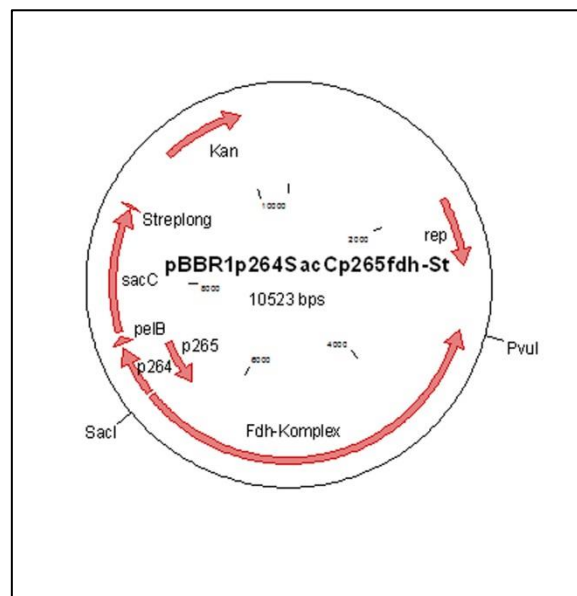
**Abbildung 35:** Umsatz von Fruktose durch ruhende Zellen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ 1687 mit dem Plasmid pBBR1p264sacCp264fdh. Die ruhenden Zellen wurden für 24 h in 1 mM Tris-HCl (pH 7) und 20 mM Fruktose inkubiert. Der Überstand der Zellsuspension wurde mittels HPLC und Ketofruktose-Reduktase-Test analysiert. Dargestellt sind die, im Überstand der Kultur gemessenen Substanzen zum Zeitpunkt 0 h (weiße Balken) und nach 24 stündiger Inkubation (schwarze Balken). Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Das Produktspektrum der ruhenden Zellen mit Fruktose als C-Quelle zeigte deutlich, dass auch die Fruktose-Dehydrogenase aktiv in der Zelle vorlag. Betrachtet man die Ergebnisse der ruhenden Zellen im Zusammenhang, wurden beide Proteine aktiv produziert. Mit Saccharose als Substrat, wurde jedoch die Fruktose, die aus der Spaltung der Saccharose entstand, nicht von der Fruktose-Dehydrogenase zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert (Abb. 34). Diese Beobachtung ist vermutlich auf den  $K_M$ -Wert der Fruktose-Dehydrogenase für Fruktose

zurückzuführen, der bei 10 mM liegt (Ameyama *et al.*, 1981a), sodass das Enzym bei Fruktosekonzentrationen, die unter diesem Wert liegen, Fruktose nur noch mit einer sehr geringen Aktivität bzw. nicht mehr umsetzt. Diese Hypothese wird von den Daten der ruhenden Zellen mit Fruktose als C-Quelle unterstützt, die zeigten, dass wenn Fruktose in höheren Konzentrationen dem System zur Verfügung steht, diese fast 1:1 zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert wird (Abb. 35). Niedrige Konzentrationen der C-Quellen Glukose und Fruktose könnten durch eine geringe Umsatzrate der Saccharose durch SacC hervorgerufen werden. Die erhobenen Daten deuten stark darauf hin, dass bei geringen Fruktosekonzentrationen die Aufnahme und Metabolisierung der Fruktose cytoplasmatisch und kein bzw. nur ein minimaler Umsatz der Fruktose durch die Fruktose-Dehydrogenase erfolgt.

### 3.5.5.3. Generierung eines Fusionsplasmids mit unterschiedlichen Promotoren

Ein weiterer Klonierungsansatz zur Generierung eines Expressionsplasmids zur Co-Produktion von SacC und dem Fdh-Komplex wurde durchgeführt, bei dem die Bifunktionalität des *p264*-Promotors genutzt wurde.



**Abbildung 36:** Expressionsplasmid pBBR1p264sacCp265fdh-St zur Co-Produktion der extrazellulären Sucrase SacC und des Fdh-Komplexes. Das Gen *sacC* steht unter der Kontrolle des *p264*-Promotors und die Gene des Fdh-Komplexes wurden hinter den Promotor *p265* kloniert. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung; *p264*: Promotorregion; Streplong: mittels Linkersequenz verlängerter Strep-Tag II

Wie Kallnik *et al.* (2012) veröffentlichten, enthält der nicht kodierende Bereich zwischen den Genen *gox0264* und *gox0265* den Promotor *p264* und kodiert gleichzeitig die Promotorregion des Gens *gox0265* in komplementär, reverser Richtung. Bei dem Promotor *p265* handelt es



sich um den Promotor des, für die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase kodierenden, Gens (*gox0265*) aus *G. oxydans* 621H. Die Gene des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes (*fdhS*, *fdhL* und *fdhC*) wurden in reverser Leserichtung hinter den Promotor *p265* kloniert (Abb. 36). Das, für die extrazelluläre Sucrase kodierende, Gen *sacC* lag wie im vorherigen Plasmid unter der Kontrolle des *p264*-Promotors. Versuche mit ruhenden Zellen, die dieses Plasmid enthielten zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Substratumsetzung und 5-Keto-D-Fruktose-Produktion, wie bei den vorherigen Fusionsplasmiden (Vgl. Kapitel 3.5.5.1 und 3.5.5.2). Wenn Saccharose als Substrat zur Verfügung stand, wurde diese innerhalb von 24 h komplett abgebaut, aber lediglich  $2,4 \pm 0,02$  mM 5-Keto-D-Fruktose erzeugt (Tab. 13).

**Tabelle 13:** Substratumsetzung ruhender Zellen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* mit dem Plasmid pBBR1p264sacCp265fdh-St mit 20 mM Saccharose als Substrat. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Zeit [h]	Fruktose [mM]	Ketofruktose [mM]	Acetat [mM]
0	$20,4 \pm 1,2$	$0,05 \pm 0,009$	$0,12 \pm 0,006$
6	$15,6 \pm 1,4$	$0,94 \pm 0,09$	$3,9 \pm 0,008$
24	$6,1 \pm 0,9$	$3,6 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,7$

Die aus der Saccharose entstandene Glukose wurde zu 2-Ketoglukonat oxidiert und die Fruktose wurde zum Großteil zu Acetat umgesetzt. Wurde Fruktose als Substrat genutzt, wurde diese zu 69,4 % abgebaut, aber lediglich 17,8 % zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert (Tab. 14). Da sowohl Saccharose abgebaut, als auch 5-Keto-D-Fruktose gebildet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl der Fdh-Komplex als auch die Sucrase SacC aktiv in der Zelle vorlagen.

**Tabelle 14:** Substratumsetzung ruhender Zellen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* mit dem Plasmid pBBR1p264sacCp265fdh-St mit 20 mM Fruktose als Substrat. Gezeigt werden die gemittelten Werte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Zeit [h]	Glukose [mM]	Saccharose [mM]	Fruktose [mM]	2-Ketoglukonat [mM]	Ketofruktose [mM]	Acetat [mM]
0	$0,99 \pm 0,03$	$19,3 \pm 1,1$	$0,15 \pm 0,003$	0	0	0
6	0	$16,4 \pm 0,09$	$2,9 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,03$	0	$1,4 \pm 0,04$
24	0	0	$5,2 \pm 0,03$	$20,7 \pm 0,07$	$2,4 \pm 0,02$	$11,9 \pm 1,3$

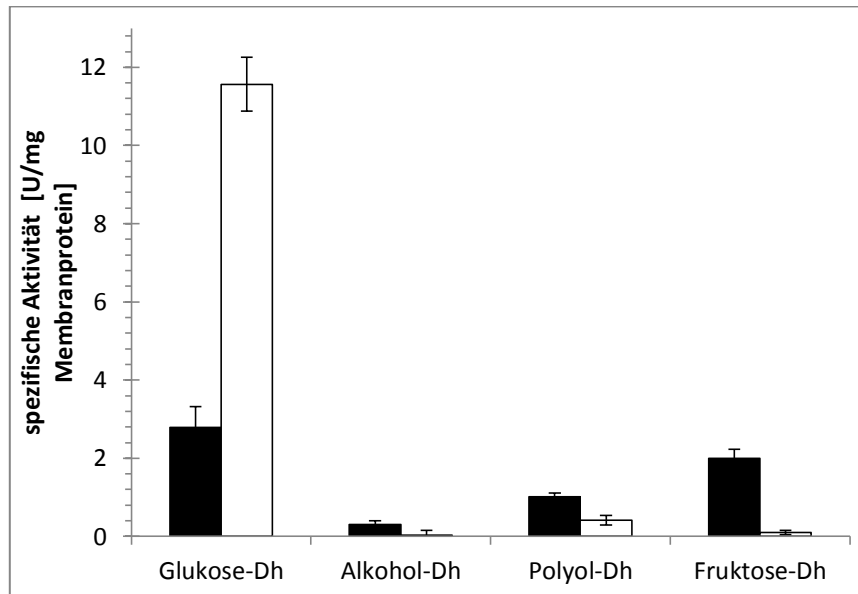
Es scheint jedoch einen, oder mehrere limitierende Faktoren in diesem System zu geben. Durch eine geringe Aktivität von SacC könnte zum Beispiel die durch die Spaltung der Saccharose entstehende Fruktose so gering konzentriert vorliegen, dass sie weit unter dem  $K_M$ -Wert der Fruktose-Dehydrogenase liegt und das Enzym aufgrund der niedrigen

Substratkonzentration nicht effizient arbeiten kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Expressions- oder Translationsrate der Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL* sehr niedrig sind und damit verbunden lediglich geringe Mengen der Fruktose-Dehydrogenase produziert werden, was die geringe Umsatzrate von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose erklären könnte. Als nächster Schritt wurde die Integration der *fdh*-Gene ins Genom angedacht, einhergehend mit einer Deletion der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase Gox0265 aus *G. oxydans*. Dazu würde das Gen *gox0265*, welches für die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase kodiert, durch die *fdh*-Gene ersetzt. Somit würden die *fdh*-Gene unter der Kontrolle des Promotors *p265* stehen und konstitutiv expremiert werden. Gleichzeitig wäre *G. oxydans* nicht mehr in der Lage Glukose periplasmatisch zu Glukonat zu oxidieren, sodass die Ansäuerung des Mediums reduziert würde.

### **3.5.6 Membranaktivität von *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR fdh* und *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR* $\Delta$ 1687 *fdh***

Da die Experimente mit ruhenden Zellen gezeigt haben, dass nur wenig 5-Keto-D-Fruktose produziert wurde (Vgl. Kap. 3.5.5), sollte zunächst die Funktionalität der 5-Keto-D-Fruktose-Dehydrogenase in der *G. oxydans*  $\Delta$ 1687-Mutante überprüft werden, bevor die Integration der *fdh*-Gene ins Genom der *G. oxydans*  $\Delta$ 1687-Mutante erfolgen sollte. Da die Integrität der äußeren Membran in dieser Mutante durch die Deletion des *tolB*-Gens herabgesetzt ist, könnte dies einen Einfluss auf den Einbau membrangebundener Enzyme haben. Aus jeweils 200 ml Kultur wurden Membranen von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* als Kontrollstamm und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ 1687 *fdh* präpariert und die Aktivität verschiedener membrangebundener Dehydrogenasen wurde gemessen. Auffallend war, dass die Aktivität der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase in der  $\Delta$ 1687-Mutante 4-fach höher war als im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* (Abb. 37). Die Aktivitäten der anderen Dehydrogenasen waren im Gegensatz zur Glukose-Dehydrogenase in der  $\Delta$ 1687-Mutante geringer als im Kontrollstamm. So zeigte die Alkohol-Dehydrogenase eine 5-fach höhere Aktivität im Kontrollstamm als in der Mutante und auch die Aktivität der Polyol-Dehydrogenase war um ein 2,5-faches erhöht. Die Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase lag im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* bei einem Wert von  $2,2 \pm 0,2$  U/mg Membranprotein, wohingegen bei den Membranen der Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ 1687 *fdh* lediglich eine Aktivität von  $0,13 \pm 0,05$  U/mg Membranprotein gemessen wurde. Somit war die Aktivität des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes um ein 17-faches niedriger in der  $\Delta$ 1687-Mutante als im Wildtyp. Dies könnte den geringen Umsatz an Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose in vorangegangenen Versuchen erklären. Da die Funktionalität der Fruktose-Dehydrogenase

im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *fdh* stark heruntergesetzt war, wurde von der Generierung eines 1-Stamm-Systems Abstand genommen und den weiteren Focus auf die biotechnologische Optimierung des 2-Stamm-Systems gelegt, um dieses an industrielle Maßstäbe anzupassen.

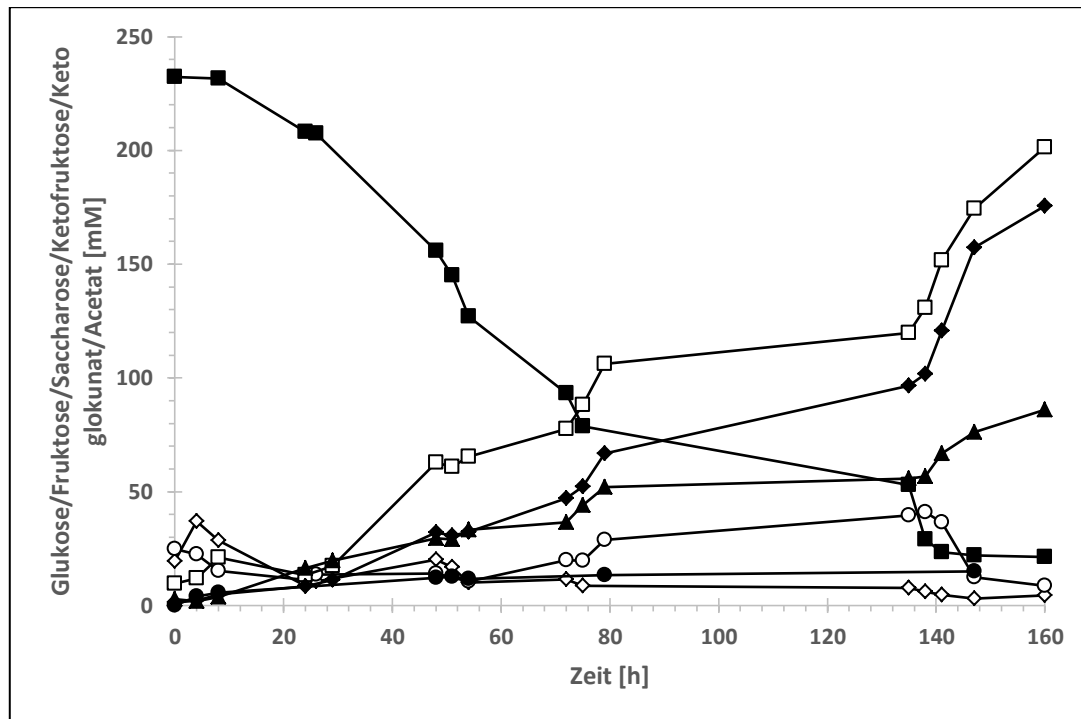


**Abbildung 37:** Aktivität der Glukose-, Alkohol-, Polyol- und Fruktose-Dehydrogenase in den Cytoplasma-Membranen von *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* (schwarze Balken) und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *fdh* (weiße Balken). Die Aktivitätstests wurden in 40 mM KPBS (pH 7) bei 30°C durchgeführt. Als Elektronenakzeptoren wurden 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS eingesetzt. Die Substratkonzentration betrug 20 mM. Dargestellt sind die gemittelten Daten aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

### 3.5.7 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrüben

Im letzten Schritt erfolgte die Optimierung der biotechnologischen Anwendung zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Saccharose mit dem 2-Stamm-System. In vorherigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass reine Saccharose mit Hilfe des 2-Stamm-Systems sehr effizient mit einer Ausbeute von 91 % in 5-Keto-D-Fruktose umgewandelt werden kann (vgl. Kap. 3.5.1). Um die Attraktivität des Systems für industrielle Zwecke zu steigern, sollte eine Optimierung des eingesetzten Substrates dahingehend erfolgen, dass pflanzliche Rohstoffe statt chemisch aufbereiteter, reiner Saccharose verwendet werden können. Dies würde zu einer Senkung der Produktionskosten führen. Saccharose dient neben Raffinose und einigen anderen Kohlenstoffverbindungen als Hauptspeicherstoff der Zuckerrüben. Für die Analyse der Zuckerrübe als geeignetes Substrat zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose wurden aus 1,4 kg Zuckerrüben ein Zuckerrübenextrakt erstellt und nachfolgend als Medium für Wachstumsexperimente genutzt. Die Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* und *G. oxydans*  $\Delta$ *I687* *sacC* wurden in YG- und YM- Medium

bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 angezogen. 49 ml Rübenextrakt wurden mit 1 ml Hefeextrakt (100 g/l) versetzt und dann mit den Kulturen *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ I687 *sacC* im Verhältnis 1:1 angeimpft.



**Abbildung 38:** Substratumsatz des 2-Stamm-Systems bei Wachstum auf Zuckerrübenextrakt. Die Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ I687 *sacC* wurden auf dem Zellextrakt von Zuckerrüben kultiviert. Der Kulturüberstand wurde mittels HPLC analysiert. Als Puffer wurde 1 M CaCO<sub>3</sub> eingesetzt. Glukose (○), Saccharose (■), Ketofruktose (□), Acetat (▲), Fruktose (◇), 5-Ketoglukonat (●) und 2-Ketoglukonat (◆). Dargestellt sind die Daten aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die OD<sub>600</sub> zu Beginn des Versuchs lag zwischen 0,1 und 0,15. Als Puffer wurde CaCO<sub>3</sub> eingesetzt, welcher zugegeben wurde, wenn der pH-Wert der Kultur unter einen Wert von 5 sank. Da CaCO<sub>3</sub> bei neutralen pH-Werten ungelöst vorliegt, führte die Zugabe des Puffers zu einer starken Trübung der Kulturen, sodass die Messung der optischen Dichte zur Verfolgung des Wachstumsverlaufes nicht möglich war. Dennoch wurde CaCO<sub>3</sub> als Puffersystem für die Experimente gewählt, da durch diesen Puffer, aufgrund seiner Unlöslichkeit, der osmotische Stress für die Zellen minimal gehalten wird. Während der Verstoffwechslung von Glukose entstehende Glukonsäuren werden durch Ca<sup>2+</sup> unter Bildung von Calcium-Glukonat neutralisiert. Die bei der Entstehung des Calcium-Glukonats freigesetzten Protonen werden durch CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> gebunden, sodass H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gebildet wird, welches anschließend größtenteils zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O dissoziiert. CO<sub>2</sub> ist gasförmig und kann aus dem Medium entweichen. Die Kultur wurde für 7 d bei 30 °C schüttelnd inkubiert und Proben wurden zu verschiedenen

Zeitpunkten aus dem Überstand entnommen. Die Überstände wurden abzentrifugiert, filtriert und verdünnt und anschließend mittels HPLC analysiert. Die HPLC-Daten zeigten, dass zu Beginn des Versuchs 232 mM Saccharose im Rübenextrakt enthalten waren. Über den Zeitraum von 160 h wurde die Saccharose fast komplett abgebaut. Nach Beendigung des Experiments konnte noch eine Saccharose-Konzentration von 21,3 mM detektiert werden. Weitere Substanzen, die zu Beginn des Versuchs gemessen werden konnten waren Fruktose, Glukose, Acetat, 5-Keto-D-Fruktose und 2-Ketoglukonat (Tab. 15). Die Fruktosekonzentration stieg in den ersten 4 h von 19,4 mM auf 37,2 mM an und fiel dann in den folgenden 20 h auf 8,7 mM ab. Im Verlauf des Versuchs schwankte die Fruktosekonzentration im Medium stetig zwischen 3 mM und 20 mM.

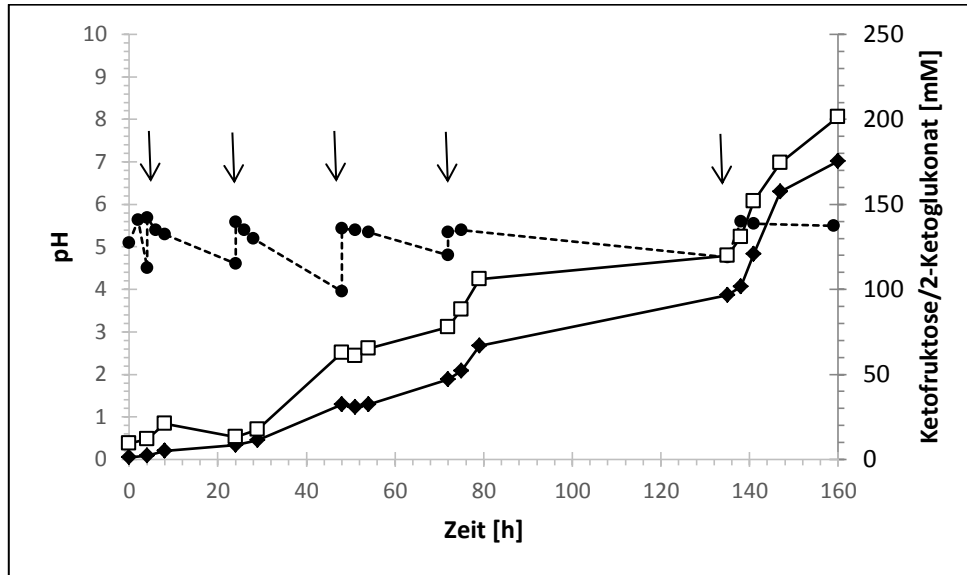
Ähnlich verhielt es sich mit der Glukose-Konzentration die zu Beginn in einer Konzentration von 24,8 mM gemessen werden konnte. Über den Zeitraum von 160 h zeigte die Glukosekonzentration einen stufenförmigen Verlauf. Nach 7 d lag die Glukose-Konzentration bei 8,7 mM. Auffallend war, dass die Bildung der Produkte 2-Ketoglukonat, Acetat und 5-Keto-D-Fruktose einen stufenförmigen Verlauf zeigten, der mit der Titration des pH-Wertes zu

**Tabelle 15:** Substrat- und Produktspektrum der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR *fdh* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR  $\Delta$ I687 *sacC* bei Wachstum auf Zuckerrübenextrakt. Die Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. KG: Ketoglukonat

Zeit [h]	Saccharose [mM]	Fruktose [mM]	Glukose [mM]	2-KG [mM]	5-KG [mM]	Acetat [mM]	Ketofruktose [mM]
0	232,4	19,4	24,8	1,3	0	2,9	9,5
160	21,3	4,5	8,7	175,5	14,9	86	201,3

korrelieren schien (Abb. 39). Über Nacht sank der pH bis zu einem Wert von 3,95, was die Aktivität der Enzyme in *G. oxydans* herabsetzen kann. Wurde der pH-Wert wieder auf einen physiologischen Wert eingestellt, konnte eine Zunahme der Produktbildungsrate beobachtet werden. 2-Ketoglukonat lag zum Zeitpunkt 0 h mit einer Konzentration von 1,3 mM vor und stieg im Laufe des Experiments an, bis nach 160 h eine maximale Konzentration von 175,5 mM gemessen werden konnte. Als weiteres Produkt wurde Acetat gebildet. Die Acetatkonzentration stieg von 2,9 mM auf einen Endwert von 86 mM an. Zudem konnte in geringen Konzentrationen von 1-15 mM 5-Ketoglukonat detektiert werden. Als Hauptprodukt wurde 5-Keto-D-Fruktose gebildet. Von insgesamt knapp 230 mM Fruktose (19,4 mM im Zuckerrübenextrakt und 211,1 mM Saccharose-Äquivalente) wurden 191,8 mM zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert. Somit konnte gezeigt werden, dass das 2-Stamm-System eine sehr effiziente Methode zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrüben ist und der

potentielle Süßstoff mit einer Ausbeute von 83,5 % aus Zuckerrübenextrakt hergestellt werden kann. Da Saccharose direkt aus dem Zellsaft der Zuckerrüben genutzt werden kann und keine Aufbereitungsprozesse zur Extraktion der Saccharose notwendig sind, ist dieses entwickelte System sehr geeignet für die biotechnologische Anwendung im industriellen Maßstab.



**Abbildung 39:** Abhängigkeit der Produktbildung vom pH-Wert bei Wachstum der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR *fdh* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 *sacC* auf Zuckerrübenextrakt. Die Titration des pH-Wertes erfolgte mittels 1 M  $\text{CaCO}_3$ . Die Abnahme der Produktproduktionsgeschwindigkeit korreliert mit der Absenkung des pH-Wertes. pH-Wert (●, gestrichelte Linie), 2-Ketoglukonat (◆), Ketofruktose (□). Schwarze Pfeile zeigen die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$ .

## 4) Diskussion

*G. oxydans* verfügt über eine Vielzahl an PQQ-abhängigen Dehydrogenasen, die verschiedene Substrate, wie Alkohole, Zucker oder Polyole regio- und stereospezifisch oxidieren (Schweiger *et al.*, 2007). Diese Regio- und Stereospezifität der Enzyme wird in industriellen Prozessen genutzt und Enzyme verschiedener Essigsäurebakterien werden bereits in industriellen Herstellungsprozessen eingesetzt (De Muynck *et al.*, 2007). Aus *G. oxydans* stammende Dehydrogenasen spielen beispielsweise eine wichtige Rolle in der Vitamin C-Synthese, bei der Herstellung von Dihydroxyaceton, welches in Bräunungsmitteln enthalten ist und bei der Produktion von 6-Amino-6-Deoxy-L-Sorbose, einem Vorläufer des Diabetes-Medikaments Miglitol (Gao *et al.*, 2014; Schedel, 2001; Voss *et al.*, 2010; Habe *et al.*, 2010). Des Weiteren findet *G. oxydans* Einsatz in der Produktion von Glukonat, das als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird. Einen Großteil dieser industriell bedeutsamen Enzyme besetzen PQQ-abhängige Dehydrogenasen, die in *G. oxydans* membranständig lokalisiert sind. Andere  $\alpha$ -Proteobakterien, wie beispielsweise *S. wittichii*, verfügen über eine Vielzahl an periplasmatischen Dehydrogenasen, die aufgrund ihrer unbekannteten Funktion vom industriellen Markt noch nicht erschlossen sind. PQQ-abhängige Dehydrogenasen weisen eine hohe Stereoselektivität bezüglich ihrer Substrate auf (Deppenmeier und Ehrenreich, 2009; Schweiger *et al.*, 2007; (Geerlof *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Stereo- und Regioselektivität können PQQ-abhängige Enzyme in der industriellen Produktion von enantiomerenreinen Substanzen eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind die Racemat-Trennung von Alkohol-Enantiomeren und die Herstellung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen, oder  $\alpha$ -Hydroxysäuren, deren S- oder R-Isomere häufig als Ausgangsstoffe für pharmazeutische Produkte genutzt werden, oder als Geschmackskomponenten für die Lebensmittelindustrie dienen (Machado *et al.*, 1999; Rabenhorst *et al.*, 2001; Schrader *et al.*, 2004). Vor allem Carboxylsäuren wie Propionsäure und Alkohole werden als geschmacks- und geruchsbildende Komponenten eingesetzt (Schrader *et al.*, 2004; Dubal *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu einer bakteriellen oder enzymatischen Synthese, ist die chemische Synthese solcher enantiomerenreiner Substanzen oft mit dem Einsatz toxischer und umweltschädlicher Stoffe, wie Nitrilsäure, Chlorit, oder Iodate, sowie mit dem Einsatz toxischer Metallkatalysatoren, wie Ruthenium oder Chromoxid verbunden (Drauz und Waldmann, 2002). Des Weiteren entstehen bei chemischen Synthesen oft unerwünschte Enantiomere, deren chemische Aufreinigung aufwendig ist. Zudem ist vor allem im Bereich der Lebensmittelindustrie beim Konsumenten eine steigende Aversion bezüglich chemisch synthetisierter und somit künstlich erzeugter Geschmackszusatzstoffe zu beobachten, was zu

einer Umorientierung hin zu alternativen Syntheseprozessen führt. Deswegen werden viele Syntheseprozesse sowie Aufreinigungen gewünschter enantiomerenreiner Stoffe durch bakterielle oder enzymatische Biokatalysatoren durchgeführt (Dubal *et al.*, 2008). Viele Aromen weisen einen pflanzlichen Ursprung auf, wie beispielsweise Pfefferminz, Erdbeere, oder der sogenannte Blatt-Alkohol (Z)-3-Hexenol, der nach frisch geschnittenem Gras riecht und oft als Geruchsstoff eingesetzt wird (Bauer *et al.*, 2001). Die Extraktion solcher Stoffe aus Pflanzen ist jedoch aufwendig und oft liegen die Substanzen nur in sehr geringen Konzentrationen vor, sodass eine bakterielle oder enzymatische Synthese solcher Aromen durch Einsatz PQQ-abhängiger Enzyme vorgezogen wird (Dubal *et al.*, 2008). Die Produktion und Charakterisierung neuer, unbekannter PQQ-abhängiger Dehydrogenasen und deren Einsatz zur Produktion enantiomerenreiner Substanzen, die unter anderem als Ausgangsstoff für die Synthese pharmazeutischer und industriell interessanter Produkte dienen, oder zur Produktion von Feinchemikalien genutzt werden können, ist somit von großem Interesse und bildet einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

#### **4.1 Identifizierung potentieller Oxidoreduktasen zur Produktion in *G. oxydans*-Stämmen**

Um Proteine zu identifizieren, die Homologien in ihren Aminosäuresequenzen zu nicht charakterisierten, charakterisierten und teilweise bereits industriell genutzten Proteinen aufweisen, wurden Blastp-Analysen durchgeführt. Als Vorlage dienten Aminosäuresequenzen löslicher und membranständiger Oxidoreduktasen aus den  $\alpha$ -Proteobakterien *G. oxydans*, *G. diazotrophicus*, *S. witichii*, *E. coli* und *K. vulgare*. Aus der Liste der ermittelten Proteine wurden 22 Enzyme für eine Produktion in *G. oxydans* 621H ausgewählt (Tab.5). Unter den ausgewählten Proteinen befanden sich sowohl eine cytoplasmatische Oxidoreduktase aus *G. oxydans* 621H, als auch periplasmatische und membranständige Dehydrogenasen aus den Bakterien *G. oxydans*, *G. diazotrophicus*, *G. japonicus*, *S. witichii*, *A. cryptum* und *A. pasteurianus*. Bis auf die Oxidoreduktase Gox1630 und dem Fruktose-Dehydrogenase-Komplex FdhLCS, die FAD als prosthetische Gruppe besitzen, waren alle übrigen Enzyme PQQ-abhängig und einige Enzyme verfügten über Häm *c* als zusätzliche prosthetische Gruppe. Als Expressionsstamm wurde *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* verwendet, der durch die Deletion des für eine Endonuklease kodierenden Gens *gox2567* eine größere Toleranz gegenüber Fremd-DNA aufweist, was für das Einbringen von Expressionsplasmiden in den Organismus von Vorteil ist.



## 4.2 Produktion löslicher Oxidoreduktasen in *G. oxydans*-Stämmen

### 4.2.1 Produktion löslicher Oxidoreduktasen in *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR*

Im ersten Teil der Arbeit lag die Produktion nicht membrangebundener Oxidoreduktasen im Vordergrund. Zum heutigen Zeitpunkt sind bereits einige periplasmatische PQQ-abhängige Dehydrogenasen bekannt, die industriell interessante Reaktionen katalysieren. Der Einsatz löslicher Dehydrogenasen in industriellen Syntheseverfahren bietet gegenüber membranständigen Proteinen den Vorteil, dass periplasmatische Enzyme leichter zugänglich und leichter aus der Zelle zu isolieren sind.

Lösliche Oxidoreduktasen spielen bereits eine wichtige industrielle Rolle und werden beispielsweise bei der Herstellung und Aufreinigung enantiomerenreiner Hydroxyketone, oder Hydroxyaldehyde eingesetzt, die als Ausgangsstoffe für die Produktion von Antibiotika, Pheromonen oder antimykotische Azole genutzt werden (Schweiger *et al.*, 2008; Palomo *et al.*, 2012). Schweiger *et al.* (2013) charakterisierten beispielsweise zwei Oxidoreduktasen aus *G. oxydans* 621H, die die stereospezifische Reduktion von  $\alpha$ -Diketonen zu den korrespondierenden (S)- oder (R)-Hydroxyketonen katalysieren. Solche enantiomerenreine (S)- oder (R)-Hydroxyketone sind chemisch schwer zu synthetisieren und dienen unter anderem als Ausgangsstoff für die Synthese pharmazeutischer Produkte, wie zum Beispiel Vitamin E (Fuganti und Grasselli, 1982; Geerlof *et al.*, 1994). Des Weiteren werden lösliche Alkohol-Dehydrogenasen zum Beispiel zur Produktion des Glycerin-Derivates Solketal sowie zur Produktion von Glycidol eingesetzt, welche in der pharmazeutischen Industrie viel genutzte Synthesebausteine bei der Produktion von Mono-, Di- und Triglycerinen darstellen (Geerlof *et al.*, 1994). Somers *et al.* (1998) zeigten zudem, dass mit Hilfe der auf einer Elektrode immobilisierten PQQ-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase aus *Commamonas testosteroni* eine enantiospezifische Aufreinigung sekundärer Alkohole der R-Konfiguration erfolgen kann, da das Enzym sehr spezifisch sekundäre Alkohole der S-Konfiguration oxidiert. Außerdem finden lösliche Oxidoreduktasen Anwendung als Biosensoren für Zucker und Alkohole, sowie in biologischen Brennstoff-Zellen (Kundu *et al.*, 2007; Smolander *et al.*, 1992; Razumiene *et al.*, 2015). Die Charakterisierung unbekannter, löslicher Oxidoreduktasen ist somit von großem industriellem Interesse.

Für die Proteinproduktion der ausgewählten Oxidoreduktasen wurden Expressionsplasmide basierend auf den von Kallnik *et al.* (2010) und Zeiser *et al.* (2014) entwickelten Vektoren pBBR1p264-S1 und pBBR1p452-S1 erstellt. Die Vektoren verfügten über Promotoren mit bekannter Expressionsstärke (*p264* - stark, *p452* - moderat), die aus *G. oxydans* 621H

stammen und bereits für Proteinproduktionen in diesem Organismus etabliert sind. Des Weiteren ermöglichte ein C-terminal kodierte, mit einer Linkersequenz verlängertes Strep-Tag II (Streplong) eine Aufreinigung der produzierten Proteine mittels Streptactin-Affinitätschromatographie. Die Expressionsplasmide, in die zuvor die für die löslichen Oxidoreduktasen kodierenden Gene kloniert worden sind, wurden mittels Elektroporation in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* eingebracht und der Nachweis der aufgereinigten Proteine erfolgte über eine spezifische Färbung mit Hilfe eines Streptactin-Konjugates. Auf diese Weise konnte die cytoplasmatische Oxidoreduktase Gox1630 aus *G. oxydans* 621H und die periplasmatische PQQ-abhängige Dehydrogenase Swit1323 aus *S. witichii* RW1 in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produziert und aufgereinigt werden (Vgl. Kap. 3.2.2).

Bioinformatische Analysen der Aminosäuresequenz von Gox1630 zeigten, dass es sich bei dem Protein vermutlich um eine Monooxygenase aus der Familie der Pyridine-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen handelt. Enzyme dieser Familie fügen Hydroxylgruppen in Substrate ein, wobei Sauerstoff reduziert und NAD(P)H oxidiert wird. FAD-abhängige Enzyme können basierend auf strukturellen Unterschieden in der FAD-Bindestelle in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Dym und Eisenberg, 2001). Die Gruppe der Glutathion-Reduktase-Familie, der Gox1630 aufgrund konservierter Motive in der Aminosäuresequenz zugeordnet werden konnte, weist sowohl im Bereich der NAD-Bindestelle, als auch im Bereich der FAD-Bindestelle eine Rossmann-Faltung auf (Dym und Eisenberg, 2001). Rossmann-Domänen besitzen eine für sie charakteristische  $\alpha/\beta$ -Faltung mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt, das von durchschnittlich 5  $\alpha$ -Helices umgeben wird (Kleiger und Eisenberg, 2002; Bashton und Chothia, 2002). Innerhalb der Aminosäuresequenz von Gox1630 konnte mit Hilfe des Programmes Interpro ein deutliches FAD-Bindemotiv im Bereich der Aminosäuren 100-290 identifiziert werden sowie eine zweite potentielle FAD-Bindedomäne am C-Terminus des Proteins, welche die Aminosäuren an Position 481-533 umfasst. Das C-terminale FAD-Bindemotiv konnte jedoch durch weitere analytische Programme, wie Pfam und SMART, nicht bestätigt werden. Die Produktion der cytoplasmatischen Oxidoreduktase Gox1630 erfolgte unter Verwendung des Expressionsplasmids pBBR1p264\_gox1630\_st. Mittels Streptactin-Affinitätschromatographie konnten 1,1 mg Protein aus 500 ml Kultur aufgereinigt werden und Western-Blot-Analysen bestätigten das Vorhandensein einer Proteinbande von 60,3 kDa, die Gox1630 entsprach. Über ein aufgenommenes UV/VIS-Spektrums des Proteins konnten die für FAD-abhängige Enzyme charakteristischen, im Bereich von 370 nm und 450 nm liegenden, Absorptionspeaks identifiziert werden, deren Maxima für Gox1630 bei 397 nm und 465 nm lagen. Dass die

FAD-typischen Absorptionsmaxima im UV/VIS-Spektrum sichtbar waren, deutet darauf hin, dass das Protein im oxidierten Zustand isoliert wurde (Ghisla *et al.*, 1974; Massey und Ganther, 1965). Über die Absorptionsmaxima des FAD und dessen Extinktionskoeffizienten konnte ein FAD:Protein-Verhältnis von 2:1 ermittelt werden. Dies würde darauf hindeuten, dass es sich bei dem zweiten mittels Interpro identifizierten potentiellen FAD-Bindemotiv tatsächlich um eine FAD-Bindestelle handelt und das Protein zwei FAD-Moleküle gebunden hat. Blast-Analysen der Aminosäuresequenz zeigten, dass innerhalb der Essigsäurebakterien zu Gox1630 homologe Proteine weit verbreitet sind. So finden sich sowohl in vielen *Gluconobacter*-Stämmen, aber auch in *Acetobacter*- und *Kozakia*-Spezies zu Gox1630 homologe FAD-abhängige Oxidoreduktasen. Da keines der homologen Proteine charakterisiert ist, konnte über die Blast-Analyse kein Hinweis auf die Funktion von Gox1630 erhalten werden. Da nicht bekannt ist, ob es sich bei Gox1630 um eine cytoplasmatische Reduktase, oder eine Oxidase handelt, wurden Enzymaktivitätstest mit DCPIP/PMS, Hexacyanoferrat(III) oder NAD(P)<sup>+</sup> als Elektronenakzeptoren oder NAD(P)H als Elektronendonator eingesetzt. Als Substrate wurden verschiedene Zucker, Zuckeralkohole, Aldehyde, Diole, Ketone, Aminosäuren, sowie organische Säuren, die als Zwischenprodukte im Stoffwechsel von *G. oxydans* auftreten, getestet, jedoch zeigte die Oxidoreduktase Gox1630 mit keinem dieser Substrate eine Aktivität. Da das Vorhandensein der prosthetischen Gruppe FAD spektrometrisch nachgewiesen werden konnte, kann die Inaktivität des Enzyms nicht auf einen fehlerhaften Einbau des FAD, oder auf eine unzureichende Beladung des Enzyms mit FAD zurückzuführen sein. Es ist anzunehmen, dass die Inaktivität der Oxidoreduktase auf die Verwendung nicht geeigneter Substrate beruhte. Während oxidativer Prozesse an den membrangebundenen Dehydrogenasen, werden entstehende Zwischenprodukte wie z.B. Fruktose, Glukonat, 2-Ketoglukonat oder 5-Ketoglukonat ins Cytoplasma aufgenommen, wo sie entweder direkt in den Pentosephosphatweg oder den Entner-Doudoroff-Weg einfließen, oder von cytoplasmatischen Oxidoreduktasen zuerst reduziert und dann verstoffwechselt werden (Deppenmeier und Ehrenreich, 2009; Olijve und Kok, 1979a). Zu diesen cytoplasmatischen Oxidoreduktasen gehören zum Beispiel die Reduktase Gox0417, die 2-Ketoglukonat zu Glukonat reduziert und die NADP-abhängige Glukonat 5-Dehydrogenase Gox2187, welche Glukonat zu 5-Ketoglukonat oxidiert (Rauch *et al.*, 2010; Klasen *et al.*, 1995). Gox1630 zeigte mit keinem der von *G. oxydans* zur Energiekonservierung bevorzugten Substrate sowie mit keinem der häufig auftretenden Intermediate, wie Glukonat, eine Aktivität. Da Oxidoreduktasen ubiquitär in der Zelle auftreten, sind die Funktionen, die diese Enzyme innehaben, äußerst divers. Da die Oxidoreduktase Gox1630 mit keinem der

eingesetzten Substrate eine Aktivität zeigte, scheint das Enzym eine hohe Spezifität bezüglich seines Substrates aufzuweisen. Laut der Datenbank Interpro gehört Gox1630 in dieselbe Proteinfamilie wie eine Thioredoxin-Reduktase aus *E. coli*. Da Gox1630 fünf Cysteine in der Aminosäuresequenz aufweist, besteht die Möglichkeit, dass das Enzym in Reduktionsvorgängen von Disulfidverbindungen involviert ist. So dienen Thioredoxin-Reduktasen beispielsweise als H<sup>+</sup>-Donatoren für Ribonukleotid-Reduktasen während der DNA-Synthese oder spielen eine Rolle in der Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen (Holmgren, 1989; Stewart *et al.*, 1998) Des Weiteren könnte Gox1630 an der Umsetzung von Intermediaten während der Biosynthese von Zellbestandteilen beteiligt sein, wie beispielsweise bei der Modifikation von Lipopolysacchariden während der Synthese der äußeren Membran (Whitfield und Trent, 2014).

Eine weitere periplasmatische Dehydrogenase, die in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* produziert werden konnte, war das Chinoprotein Swit1323 aus *S. wittichii* RW1. *S. wittichii* gehört zu den  $\alpha$ -Proteobakterien und besitzt die besondere Eigenschaft giftige und umweltschädliche Stoffe wie Dioxine, Naphtalene und Biphenyle abbauen zu können (Miller *et al.*, 2010; Balkwill *et al.*, 2006). Sphingomonaden werden nicht nur in biologischen Dekontaminierungsprozessen von Umweltschadstoffen eingesetzt, sondern auch für die Produktion spezieller Polysaccharide genutzt, so genannter Sphingone, die im Bereich der Lebensmittel-, Pharma- und klinischen Industrie Einsatz finden (Fialho *et al.*, 2008). *S. wittichii* verfügt über eine Vielzahl nicht charakterisierter PQQ-abhängiger Dehydrogenasen, auch Chinoproteine genannt, die im Hinblick auf die Fähigkeit des Organismus giftige Stoffe abzubauen, interessante Funktionen aufweisen und beispielsweise in der Detoxifizierung von Aldehyden eingesetzt werden könnten, wie die von Zeiser *et al.* (2014) charakterisierte Aldehyde-Dehydrogenase Swit4395.

Chinoproteine sind Oxidoreduktasen, die PQQ als prosthetische Gruppe besitzen und Substrate wie z. B. Alkohole, Zucker oder Amine oxidieren und somit in vielen Bakterien eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel spielen (Oubrie *et al.*, 2002). Die Gene zur PQQ-Synthese sind in *G. oxydans* in einem Operon pqqABCDE codiert. Die Aufgabe der einzelnen, an der PQQ-Synthese beteiligten, Proteine ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass PqqC den finalen Syntheseschritt des PQQ katalysiert und PqqB beim Transport des PQQ ins Periplasma involviert ist. Die Aminosäuresequenz von PqqA besitzt C-terminal die Aminosäuren Glutamat und Tyrosin, die die Grundbausteine des PQQ bilden, und fungiert vermutlich als Substrat für PqqE (Hölscher und Görisch, 2006;

Bonnot *et al.*, 2013). PQQ ist ein aromatisches, heterozyklisches ortho-Chinon und wurde erstmals 1964 von Hauge in einer Glukose-Dehydrogenase aus *Bacterium anitratum* nachgewiesen (Magnusson *et al.*, 2004; Hauge, 1964). In Tieren und Menschen übernimmt PQQ die Funktion eines wichtigen Radikalfängers und wirkt unter anderem als neuronaler Schutzstoff bei Ratten. Studien zeigten zudem, dass eine PQQ-arme Nahrungszufuhr bei Mäusen zu Hautproblemen und zur Schwächung des Immunsystems führte (Killgore, 1989). Aufgrund seiner antioxidierenden und protektiven Eigenschaften wird die Ernennung von PQQ als neues Vitamin B diskutiert (Kasahara und Kato, 2003). Die Aufnahme von PQQ, welches in einer Vielzahl von Pflanzen und auch in Fleisch nachgewiesen werden konnte, erfolgt bei Menschen und Tieren über die Nahrung (Misra *et al.*, 2012; Ameyama *et al.*, 1985a).

PQQ wird aus den Aminosäuren Glutamat und Tyrosin synthetisiert und besitzt drei stabile Redoxzustände. Bei Reduktion von PQQ zu PQQH<sub>2</sub> werden zwei Elektronen und zwei Protonen auf das PQQ übertragen, welche entweder direkt an nachgeschaltete Elektronenakzeptoren wie membranintegrierte Chinone weitergeleitet werden, sodass eine vollständige Oxidation des PQQH<sub>2</sub> erfolgt, oder nacheinander übertragen werden, sodass das PQQ zunächst nur teilweise oxidiert wird und als Semichinon (PQQH) vorliegt (Anthony, 2001). Freies, gelöstes PQQ bildet Komplexe mit nukleophilen Komponenten wie Alkoholen, Aldehyden, Hydrazinen, Ammonium, etc. Die Bindung von PQQ an das Protein erfolgt im Periplasma und benötigt die Anwesenheit eines zweiwertigen Ions, in den meisten Fällen Ca<sup>2+</sup> (Oubrie *et al.*, 2002; Anthony, 2001). Obwohl PQQ-abhängige Proteine ein konserviertes Tryptophan-Bindemotiv aufweisen, ist dieses nicht an der eigentlichen Bindung des PQQ beteiligt, sondern dient zur Stabilisierung der Proteinstruktur (Oubrie *et al.*, 1999; Oubrie *et al.*, 2002; Anthony, 2001) Chinoproteine lassen sich aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in verschiedene Klassen unterteilen. Grundsätzlich weisen Chinoproteine einen N-terminal gelegenen  $\beta$ -Propeller auf, der sich aus acht (Klasse I) oder sechs (Klasse II) viersträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzt, welche eine zirkuläre Anordnung aufweisen (Anthony, 2001; Oubrie *et al.*, 1999; Oubrie *et al.*, 2002). Die von Olsthoorn und Duine (1996) charakterisierte lösliche Glukose-Dehydrogenase aus *Acinetobacter (A.) calcoaceticus* gehört der Klasse II der Chinoproteine an, wohingegen die Methanol-Dehydrogenasen aus methylotrophen Bakterien beispielhafte Vertreter der Klasse I-Chinoproteine sind (Ghosh *et al.*, 1995; Duine *et al.*, 1979; Frank *et al.*, 1988). Innerhalb der Klasse I der PQQ-abhängigen Dehydrogenasen werden wiederum zwei Gruppen unterschieden. Die erste Gruppe umfasst verschiedene Ethanol-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas*-Spezies sowie Methanol-

Dehydrogenasen aus methylotrophen Bakterien. Der zweiten Gruppe werden alle Alkohol-Dehydrogenasen zugeordnet, die zusätzlich zum PQQ ein C-terminal gelegenes Häm *c* als prosthetische Gruppe aufweisen. Innerhalb der zweiten Gruppe werden zusätzlich die löslichen und die membrangebunden Chinohämproteine differenziert.

Bei dem nicht-charakterisierten Chinohämprotein Swit\_1323 aus *S. wittichii* RW1 handelt es sich laut Datenbankanalysen um eine Alkohol-Dehydrogenase, die der Klasse I der periplasmatischen Chinohämprotein zugeordnet werden kann. Swit1323 weist jedoch deutliche sequenzielle Unterschiede zu bisher charakterisierten Alkohol-Dehydrogenase auf, da das Häm-Bindemotiv der Aminosäuresequenz N-terminal lokalisiert ist und nicht C-terminal, wie für Chinohämproteine typisch. Analysen durch bioinformatische Programme zeigten, dass die Aminosäuresequenz von Swit1323 drei bis sieben potentielle PQQ-Bindemotive aufweist, die sich über die gesamte Sequenz verteilen und für die Bindung von PQQ erforderlich sind. Die Dehydrogenase Swit1323 konnte in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* produziert und mittels Western Blot nachgewiesen werden. Insgesamt konnte eine Proteinmenge von 0,55 mg aus 500 ml Kultur isoliert werden. Für die anschließenden Enzymaktivitätstests wurden Substrate verschiedener Substratklassen eingesetzt, darunter Zucker, Alkohole, Diole, Aldehyde und Polyole. Es konnte unter den getesteten Bedingungen keine Aktivität des Enzyms mit einer der Substratklassen verzeichnet werden. Swit1323 besitzt laut bioinformatischer Analysen PQQ und Häm *c* als prosthetische Gruppen, die nach Translokation des Proteins im Periplasma in das Apoprotein eingebaut werden. Der Einbau von prosthetischen Gruppen in ein Enzym ist maßgeblich an der korrekten Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins beteiligt und somit essentiell für dessen Aktivität (Thöny-Meyer, 1997; Anthony, 2001). Sowohl Cytochrome, als auch PQQ besitzen eine spezifische Eigenabsorption und können mittels UV/VIS- Spektroskopie identifiziert werden. Bei Häm *c* -haltigen Proteinen treten drei charakteristische Peaks im Bereich von 415-423 nm ( $\gamma$ - Peak), 521-527 nm ( $\beta$ -Peak) und 550-558 nm ( $\alpha$ -Peak) auf (Lemberg und Barrett, 1973). Hinweise auf die Liganden eines Häms können durch das Auftreten eines weiteren Peaks im langwelligen Bereich erhalten werden, der jedoch nur im oxidierten Zustand des Proteins sichtbar ist. High-Spin-Häme zeigen einen Peak im Bereich von 630 nm und eine vorliegende His-/Met-Ligation kann durch das Auftreten eines Peaks im Bereich von 690/700 nm postuliert werden (Branca *et al.*, 2007). Der Absorptionsbereich von PQQ überschneidet sich teilweise mit den Absorptionsbereichen von Häm *c*, da PQQ Absorptionsmaxima bei 300 nm und 420 nm aufweist (Anthony, 2001). Der Nachweis, dass die prosthetischen Gruppen PQQ und Häm *c* des Proteins Swit1323 in das Enzym eingebaut wurden, sollte mittels UV/VIS-

Spektroskopie erfolgen. Da die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Isolaten sehr niedrig waren, konnten die für die prosthetischen Gruppen charakteristischen Peaks im Proteinspektrum jedoch nicht identifiziert werden, sodass der Nachweis des korrekten Einbaus der prosthetischen Gruppen anderweitig erfolgen musste. Eine weitere Methode zum Nachweis von Häm bietet die Hämfärbung, bei der die Peroxidase-Aktivität des Häm *c* genutzt wird um Häm-haltige Proteine mit Hilfe des Chromogens TMBZ und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spezifisch anzufärben (Thomas *et al.*, 1976; Goodhew *et al.*, 1986). Eine solche mit Swit1323 durchgeführte spezifische Färbung zeigte jedoch keinerlei Signal, sodass der Einbau von Häm *c* in das Enzym nicht bestätigt werden konnte. Für die Detektion enzymatischer Aktivität ist der Einbau von Häm *c* ins Protein zwar nicht essentiell, da im Aktivitätstest die Elektronenübertragung auf die Elektronenakzeptoren DCPIP/PMS unmittelbar von der prosthetischen Gruppe PQQ auf den Elektronenakzeptor erfolgen kann; jedoch übt die Integration des Häm *c* einen großen Einfluss auf die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur des Proteins aus. Da keine zuverlässigen, alternativen Nachweismethoden für das Vorhandensein von PQQ in Enzymen mit unbekannter Funktion beschrieben sind, wurde eine Rekonstitution des Proteins Swit1323 durchgeführt, bei der die prosthetische Gruppe in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> *in vitro* in das Enzym eingebracht wird. Auch nach erfolgter Rekonstitution des Proteins war keine Enzymaktivität zu detektieren. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Inaktivität des Enzyms ausschließlich auf dem Fehlen des PQQ beruhte. Der Einbau prosthetischer Gruppen in ein Polypeptid trägt essentiell zur korrekten Faltung des Proteins bei. Durch die Bindung des PQQ in Chinohämproteine beispielsweise kommt es zu einer Konformationsänderung der Peptidstruktur, die die Orientierung des Methionin-Liganden des Häm *c* beeinflusst und zu einem Anstieg der Elektronendichte am Pyrrol-Ring führt, sowie Einfluss auf das Redoxpotential des Häm *c* nimmt (Anthony, 2001). Ohne die Bindung der prosthetischen Gruppen PQQ und Häm *c* würden diese Konformationsänderung und die damit korrekte Faltung des Proteins, welche zu seiner aktiven Form führt, nicht erfolgen. Da beide prosthetischen Gruppen periplasmatisch ins Enzym eingefügt werden und nachgewiesen werden konnten und der Einbau des Häm *c* nicht erfolgte, ist anzunehmen, dass auch das PQQ nicht korrekt ins Protein eingebaut wurde. Somit lässt sich die Inaktivität von Swit1323 auf das Fehlen der prosthetischen Gruppen und eine damit verbundene inkorrekte Faltung des Proteins zurückführen.

Die Produktionseffizienz der löslichen Oxidoreduktasen in *G. oxydans* 621HΔ*hdsR* war gering (Vgl. Kap. 3.2.2). Lediglich 2 von 11 Proteinen konnten produziert und aufgereinigt werden. Untersuchungen zur Expression der, für die Oxidoreduktasen kodierenden, Gene

wurden am Beispiel des Gens *swit1054* durchgeführt. Bei Versuchen zur Proteinproduktion von Swit1054, einer putativen Glukose-Dehydrogenase, konnte kein Protein mittels Western Blot nachgewiesen werden. Experimente zur Expression von *swit1054* in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* zeigten, dass die Transkription des auf dem Expressionsplasmid pBBR1p264\_*swit1054*\_SI kodierten Gens stattfand. Trotz Expression des Gens *swit1054* unter dem starken *p264*-Promotor, lag das Expressionslevel des Gens um ein 0,24-faches unter dem Expressionslevel des Haushaltsgens *gox0508*. Kallnik *et al.* (2010) zeigten durch Expressionsstudien in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*, dass, bei Expression der Gene unter der Kontrolle des *p264*-Promotors, das Expressionsverhältnis vom Modelgen *uidA*, welches für eine  $\beta$ -D-Glukuronidase codiert, zum Haushaltsgen *gox0508* bei  $340 \pm 150$  lag. Im Vergleich dazu ist das Expressionsverhältnis von *swit1054* und *gox0508*, das bei 0,5 lag, sehr niedrig. Dennoch konnte eine generelle Transkription von *swit1054* nachgewiesen werden. Somit sind die Gründe für die ausbleibende Proteinproduktion nicht auf der Ebene der Genexpression zu finden. Ein schneller Abbau der mRNA aufgrund instabiler Sekundärstrukturen stellt, neben einer geringen Transkriptionsrate, eine weitere potentielle Erklärung für die geringe RNA-Konzentration von *swit1054* dar. Die Erhöhung des Expressionslevels wäre durch die Verwendung eines alternativen Expressionssystems möglich. Die Entwicklung neuer Expressionssysteme für *G. oxydans* steht seit langem im Fokus der Forschung, da nur wenige etablierte Expressionssysteme für diesen Organismus existieren. Unter anderem wurden Expressionsvektoren konstruiert, die Promotoren membrangebundener Dehydrogenasen aus *G. oxydans* besaßen, wie z. B. der Promotor der Alkohol-Dehydrogenase-Gene *adhAB*, die sich für die Expression membrangebundener Enzyme in *G. oxydans* eignen (Kawai *et al.*, 2013; Mientus *et al.*, 2017). Ein weiterer Vorteil wäre die Etablierung eines Expressionssystems, das über einen induzierbaren Promotor verfügt. Mientus *et al.* (2017) zeigten, dass die Expressionsstärke des Promotors der Inositol-Dehydrogenase (*Gox1857*) aus *G. oxydans* 621H Substrat abhängig ist, sodass die Expressionsstärke durch die Verwendung unterschiedlicher C-Quellen beeinflusst werden kann. Untersuchungen von Bartisch (2012) zur Expression von Genen unter Kontrolle des induzierbaren *Tet*-Promotors in *G. oxydans* 621H wiesen darauf hin, dass der Promotor bereits ohne Induktion ein hohes Grundexpressionslevel aufwies, welches die Expressionsstärke des *p264*-Promotors überstieg. Somit eignet sich dieses in *E. coli* etablierte Expressionssystem nicht für eine schonende Proteinproduktion in *G. oxydans*. Zur Entwicklung eines induzierbaren Expressionsvektors für *G. oxydans* ist die Verwendung eines aus *G. oxydans* stammenden Promotors von Vorteil. Eine Identifizierung von Genen, die nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch eine



Änderung der Wachstumsbedingung aktiviert werden, müsste erfolgen. Über anschließende Expressionsstudien unter Verwendung von Reporterproteinen, wie UidA oder PhoA, könnte dann die Expressionsstärke der Promotoren der identifizierten Gene analysiert werden.

Ein weiterer möglicher Grund, dass viele der Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* nicht produziert werden konnten, kann auf Probleme bei der Translation und Biosynthese der Dehydrogenasen zurückzuführen sein. Bei einer sehr geringen Translationsrate kann die entstehende Proteinmenge zu gering sein, um mittels Western Blot detektiert werden zu können. Eine niedrige Translationsrate kann auf einer Überlastung des Proteinbiosynthese-Apparates in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* basieren, sodass die Synthese heterologer Proteine nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß stattfindet. Da die membrangebundenen Dehydrogenasen von *G. oxydans* 621H einen großen Anteil am Proteom ausmachen, wurde für die weitere Proteinproduktion der Expressionsstamm gewechselt und die Produktion periplasmatischer Dehydrogenasen in der Mutante *G. oxydans* BP.9 durchgeführt. Diese Mutante zeichnet sich durch die Deletion aller membrangebundenen Dehydrogenasen bis auf die Laktat-Dehydrogenase aus, sodass der Proteinbiosynthese-Apparat der Mutante entlastet ist und eine erhöhte Kapazität für die Biosynthese heterologer Proteine vorliegt (Peters *et al.*, 2013). Anders als bei Eukaryoten besitzen prokaryotische Zellen keine intrazellulären Kompartimente, sodass die cytoplasmatische Membran die einzige Membran innerhalb der Zelle ist, die einen Raumabschluss generiert, indem sie das Cytoplasma vom Periplasma trennt. Dementsprechend bildet diese Membran auch die einzige Möglichkeit ein elektrochemisches Potential aufzubauen, welches für die Energiekonservierung genutzt werden kann. Da die Energiekonservierung in *G. oxydans* hauptsächlich über Oxidationsprozesse von membranständigen Dehydrogenasen abläuft, ist die cytoplasmatische Membran des Organismus dicht besetzt mit Dehydrogenasen und Proteinen der Atmungskette (Prust *et al.*, 2005; Deppenmeier *et al.*, 2002; Ameyama *et al.*, 1984). Studien zeigten zudem, dass *G. oxydans* bei Wachstum auf Glycerol und Sorbitol am Ende der exponentiellen Phase zusätzliche intracytoplasmatische Membranen ausbildet, um die Oxidationskapazität der Zelle zu maximieren (Claus *et al.*, 1975; White und Claus, 1982). Da in der BP.9-Mutante fast alle für membranständige Dehydrogenasen kodierenden Gene deletiert worden sind, ist die Besetzung der cytoplasmatischen Membran durch diese Enzyme stark verringert und bietet somit Raum zum Einbau von heterolog-produzierten Proteinen.

#### 4.2.2 Produktion löslicher Oxidoreduktasen in *G. oxydans* BP.9

Durch den Einsatz der *G. oxydans* BP.9-Mutante als Expressionsstamm konnte die Produktionseffizienz der nicht charakterisierten Dehydrogenasen verdoppelt werden (Vgl. Kap. 3.2.4). Neben der Oxidoreduktase Gox1630 konnten die periplasmatischen Dehydrogenasen Swit0721 aus *S. wittichii* RW1, sowie die Proteine Acry1741 und Acry2797 aus *A. cryptum* JF-5 in *G. oxydans* BP.9 produziert und mittels Western Blot nachgewiesen werden. Bei anschließenden Enzymaktivitätstests wurde jedoch mit keinem der getesteten Substrate eine Aktivität bei einer der Dehydrogenasen gemessen. Auch Enzymaktivitätstests an ganzen Zellen zeigten keine Unterschiede in der Substratumsatzrate zwischen der Mutante BP.9 und den BP.9-Stämmen, die die jeweiligen Expressionsplasmide zur Produktion der nicht charakterisierten Dehydrogenasen trugen. Somit konnte kein Hinweis auf die Funktion der bislang unbeschriebenen Proteine erhalten werden.

Da nicht zu differenzieren war, ob die Inaktivität der Enzyme auf eine inkorrekte Faltung der Proteine oder auf die Wahl ungeeigneter Substrate zurückzuführen war, wurde die Aldose-Dehydrogenase YliI aus *E. coli* als Modellprotein für eine Produktion in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR gewählt. Da im Gegensatz zu den nicht charakterisierten Dehydrogenasen das Substratspektrum der PQQ-abhängigen Dehydrogenase YliI bekannt ist (Southall *et al.*, 2006), konnte zwischen einer Inaktivität basierend auf der Substratwahl und einer Inaktivität basierend auf der fehlerhaften Faltung des Proteins unterschieden werden. Bei der Aldose-Dehydrogenase aus *E. coli* handelt es sich um ein Monomer, das ein Molekül PQQ und zwei Moleküle  $\text{Ca}^{2+}$  pro Enzymeinheit bindet. Ein Calciumion dient dabei zur Bindung von PQQ und das zweite zur Stabilisierung der Proteinstruktur. Bezüglich der Klassifizierung des Enzyms gehört YliI, ebenso wie die Glukose-Dehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus*, zu der Klasse II der PQQ-abhängigen Dehydrogenasen, die einen sechsblättrigen Propeller aufweisen. *E. coli* besitzt kein Gencluster zur Synthese von PQQ und muss dieses aus dem extrazellulären Raum aufnehmen um ein aktives Protein zu generieren. YliI besitzt eine Größe von 39 kDa und weist ein breites Substratspektrum auf. Neben einer Vielzahl an Monosacchariden, wie beispielsweise D-Arabinose (295 U/mg), Lyxose (261 U/mg) und Galaktose (192 U/mg), oxidiert das Enzym auch Di- und Polysaccharide, sowie Zuckerderivate wie 2-Deoxy-Glukose oder Glukose-6-Phosphat. Auffallend sind die hohen  $K_M$ -Werte des Enzyms für Glukose (400 mM), Maltose (170 mM) und Maltobiose (150 mM) (Southall *et al.*, 2006). Die Aldose-Dehydrogenase YliI wurde in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR produziert und immunologisch nachgewiesen. Bei Aktivitätstest des Enzyms mit Glukose, Maltose, Lyxose und Galaktose als Substrat konnte keine

Enzymaktivität detektiert werden. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass auch die Inaktivität der anderen periplasmatischen Dehydrogenasen aus *S. wittichii* und *A. cryptum* nicht auf die Verwendung des falschen Substrates zurückzuführen ist. Sowohl die Dehydrogenasen YliI, Acry1741 und Acry2797, als auch Swit1323 und Swit0721 besitzen ein Sec-Signalpeptid und werden mit Hilfe des Sec-abhängigen Transportsystems über die cytoplasmatische Membran ins Periplasma transportiert. Im Gegensatz zur Proteintranslokation über das Tat-Transportsystem, liegen die Proteine beim Sec-abhängigen Transport in ihrer nativen, ungefalteten Form vor. Die Faltung des Proteins und der Einbau jeweiliger prosthetischer Gruppen wie PQQ, oder Häm *c* erfolgt dann im Periplasma (Driessen, A. J. M. und N. Nouwen, 2008; Garrard, 1972; Cristóbal *et al.*, 1999). Sollten Probleme bei der Translokation der Proteine auftreten und diese nicht ins Periplasma gelangen, lägen sie zum Zeitpunkt der Aufreinigung als ungefaltete Proteine bzw. nicht in ihrer Tertiärstruktur vor, was einen Grund für die Inaktivität der Enzyme darstellen könnte. Um dies zu analysieren wurden Untersuchungen zum Proteintransport mit der putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 in der Mutante *G. oxydans* BP.9 durchgeführt.

#### **4.2.3 Untersuchungen zur Proteintranslokation**

Die Fraktionierung von Zellen ist eine gängige Methode, um in bakteriellen Zellen Cytoplasma, Periplasma und Membranen und in eukaryotischen Zellen zusätzliche Zellorganellen zu separieren. Auf diese Weise kann die Lokalisierung und Aktivität von Proteinen und anderen Komponenten in der Zelle analysiert werden. Die Entfernung der bakteriellen Zellwand oder der äußeren Membran kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, beispielsweise durch mechanische Krafterübung mittels French Press, Ultraschall, oder enzymatischer Zellyse (Schnaitman, 1970; Guerlava *et al.*, 1998). Da bei diesen Aufschlussmethoden das Risiko besteht auch die cytoplasmatische Membran zu beschädigen, wird bei Zellfraktionierungen von Gram-negativen Bakterien die Lyse der äußeren Membran plasmolytisch durch einen osmotischen Schock, sowie durch Zugabe von EDTA und Lysozym herbeigeführt (Garrard, 1972; Wood, 1978; Birdsell und Cota-Robles, 1967). Die Auftrennung von Zellbestandteilen erfolgt anschließend mittels Zentrifugation, wobei je nach Intention der Zellanalyse eine differenzielle Zentrifugation oder eine Gradienten-Zentrifugation durchgeführt wird und die Zellbestandteile nach Größe oder Dichte aufgetrennt werden (Hancock und Nikaido, 1978). Ein Beispiel für die Fraktionierung von Zellen ist die Präparation von Sphäroplasten, den Protoplasten Gram-negativer Bakterien, bei denen die Zellwand aufgebrochen und teilweise entfernt wurde. Sphäroplasten werden unter anderem dazu genutzt Vorgänge wie die Freisetzung von Enzymen und die Akkumulation von

Metaboliten zu studieren (Birdsell und Cota-Robles, 1967). Wood (1978) führte beispielweise Untersuchungen zur Nitrit-Reduktase aus *Pseudomonas aeruginosa* mittels Zellfraktionierung durch, um zu ermitteln, ob es sich bei dem Enzym des intrazellulären Schwefelstoffwechsels um ein periplasmatisches oder ein cytoplasmatisches Protein handelt. Dabei wurden die Zellen durch Zugabe eines EDTA/Saccharose-Puffers aufgeschlossen und die Zellkompartimente mittels Zentrifugation getrennt. Durch enzymatische Tests konnte anschließend gezeigt werden, dass es sich bei der Nitrit-Reduktase um ein periplasmatisches Enzym handelt. Somit konnte die Rolle des Proteins im Energiestoffwechsel von *P. aeruginosa* analysiert werden (Wood, 1978). Innerhalb dieser Arbeit wurde diese Methodik der Zellfraktionierung angewandt, um die Lokalisierung der periplasmatischen Dehydrogenase Acry1741 zu analysieren. Da das Substrat des Enzyms unbekannt ist, konnte der Nachweis des Proteins nicht enzymatisch wie bei Wood (1978) erfolgen, sondern durch Proteinaufreinigung aus den verschiedenen Zellfraktionen und Western Blot-Analysen.

Translokationsanalysen mittels Zellfraktionierung und Western-Blot-Analysen zeigten, dass die putative Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 mit dem nativen Signalpeptid aus *A. cryptum* JF-5 bei einer heterologen Expression in *G. oxydans* nicht über die cytoplasmatische Membran transportiert wurde und inaktiv im Cytoplasma vorlag (Vgl. Kap. 3.2.7). Acry1741, sowie alle weiteren periplasmatischen Dehydrogenasen, die in dieser Arbeit produziert werden sollten, besitzen Signalpeptide für eine Translokation über den Sec-abhängigen Transporttyp. Der Sec-abhängige Transport von Proteinen ins Periplasma ist in Gram-negativen Bakterien das meist genutzte Translokationssystem (Pugsley, 1993). Proteine werden dabei in ihrem nativen, ungefalteten Zustand über die cytoplasmatische Membran ins Periplasma transportiert. Das Sec-Transportsystem besteht aus mehreren Komponenten. Während der Translation und der Biosynthese des kompatiblen Proteins am Ribosom, bindet die lösliche Untereinheit SecB, oder ein sogenannter Signalpeptid-Erkennungs-Faktor (SRP, signal recognition partical) an eine bestimmte Region des proteineigenen Signalpeptids, die sich durch eine hohe Dichte an aromatischen oder basischen Aminosäuren auszeichnet und transportiert die Aminosäuresequenz zum Sec-Komplex (SecABCD) an der cytoplasmatischen Membran (Knoblauch *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 2000). Bei der Bindestelle von SecB für die Signalsequenz des Proteins handelt es sich um kein konserviertes Motiv, welches in allen Gram-negativen Bakterien identisch ist (Driessen und Nouwen, 2008; Knoblauch *et al.*, 1999). Somit besteht die Möglichkeit, dass die SecB-Erkennungssequenz der nativen Signalpeptide der heterolog in *G. oxydans* produzierten periplasmatischen Dehydrogenasen von den SecB-Signalpeptidsequenzen der Organismus

eigenen Proteine abweicht. Dies könnte zu einer niedrigeren Affinität von SecB zu den heterologen Proteinen führen und einer damit verbundenen schwächeren Bindung zwischen SecB und dem zu transportierenden Protein. Konkurrieren native und heterolog produzierte Proteine um die im Cytoplasma enthaltenen SecB-Proteine könnte eine höhere Affinität von SecB zu nativen Proteine dazu führen, dass diese Proteine bevorzugt transportiert werden und eine Translokation der heterologen Proteine ausbleibt. In der cytoplasmatischen Membran befindet sich der Proteinkomplex SecYEG, der die Membran mehrfach durchspannt und einen verschließbaren Kanal bildet, der eine maximale Größe von 15-20 Å aufweist (Brundage *et al.*, 1990; Driessen, A. J. M. und N. Nouwen, 2008). Sowohl der N-, als auch der C-Terminus des SecY-Proteins, welches die cytoplasmatische Membran mit 10 Transmembranhelices durchspannt, sind ins Cytoplasma orientiert, wo sie mit dem Protein SecA interagieren. SecA ist ein ATP-abhängiges Motorprotein und verfügt über eine konservierte Bindedomäne für SecB. Kommt es zur Bindung zwischen SecA und SecB wird die Aminosäuresequenz des zu transportierenden Proteins auf SecA übertragen und die Translokation des nativen Proteins initiiert. Durch das Binden von ATP an SecA kommt es zu einer Konformationsänderung von SecA, sowie des SecYEG-Komplexes, die zur Öffnung des Proteinkanals führt (Douville *et al.*, 1995). Die genauen Mechanismen des Translokationsvorganges sind nicht vollständig erschlossen, es wird jedoch angenommen, dass durch die Hydrolyse von ATP eine weitere Konformationsänderung des SecA-Proteins bewirkt wird sowie eine Lösung der Bindung zum Signalpeptid des zu transportierenden Proteins eintritt. Durch diese Konformationsänderung wird das Protein in den SecYEG-Kanal geleitet. Für den weiteren Translokationsvorgang bestehen verschiedene Theorien. Zum einen wird angenommen, dass die Translokation des Proteins durch Brawnian'sche Bewegungen bewirkt wird, zum anderen liegen Erkenntnisse vor, dass ein erneutes Binden und Lösen von SecA an die Peptidsequenz ein Voranschieben der Polypeptidkette durch den SecYEG-Kanal bewirken könnte (Van Dalen *et al.*, 1999; Driessen, A. J. M. und N. Nouwen, 2008). Studien von Van Dalen *et al.* (1999) zeigen zudem, dass eine Wechselwirkung zwischen der Signalpeptidsequenz des Proteins und der Protonenmotorischen-Kraft besteht, die ebenfalls in der Translokation des Proteins beteiligt ist. Die Signalsequenz des Proteins wird während des Transportvorgangs durch membranständige Peptidasen abgetrennt.

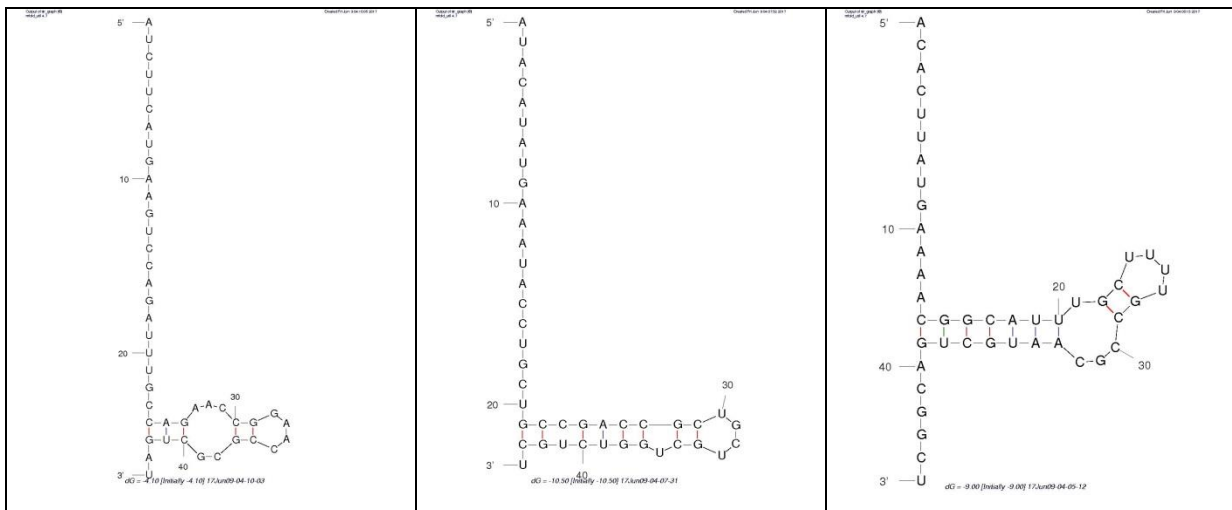
Entscheidend für die Effizienz einer Proteintranslokation ist das Signalpeptid eines Proteins. Diese Sequenz ist meist am N-Terminus der Aminosäuresequenz lokalisiert, kann jedoch auch C-terminal, oder in seltenen Fällen mittig in der Sequenz lokalisiert sein (Martoglio und Dobberstein, 1998). Obwohl sich Signalsequenzen in ihrer Länge und Zusammensetzung

stark unterscheiden, lassen sich alle Signalpeptide in drei Domänen gliedern. Die N-terminale Domäne (N-Domäne) ist kurz und umfasst bis zu 3 Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten. Die darauffolgende H-Domäne bildet den Hauptteil des Signalpeptids, besteht aus 10 – 20 Aminosäuren und zeichnet sich durch eine hohe Hydrophobizität aus. Die dritte Domäne ist die C-Domäne, die sich durch das Auftreten von Aminosäuren mit neutralen Seitenketten an Position -1 und -3 auszeichnet und in der die Schnittstelle (Ala-X-Ala) für die Signal-Peptidase I liegt (Martoglio und Dobberstein, 1998; Van der Sluis und Driessen, 2006; Von Heijne, 1990). Studien zeigten, dass die Beschaffenheit des Signalpeptids maßgeblich für die Translokationseffizienz, mit der ein Protein über die cytoplasmatische Membran transportiert wird, verantwortlich ist. Die Voraussage einer optimalen Signalpeptidsequenz ist jedoch nicht möglich, da sich zeigte, dass die Qualität/Effizienz eines Signalpeptids stark abhängig von der Aminosäuresequenz des Zielproteins ist. Somit muss die Optimierung einer Signalsequenz für jedes Protein individuell durchgeführt werden (Heggeset *et al.*, 2013; Van der Sluis und Driessen, 2006). Sletta *et al.* (2007) zeigten, dass die Generierung einer Consensus-Signalsequenz, basierend auf Sequenzvergleichen von Signalpeptidsequenzen Gram-negativer Bakterien, die Expression und die Translokation einer  $\beta$ -Laktamase in *E. coli* um ein achtfaches steigern konnte. Diese künstlich erzeugte Signalsequenz zeigte jedoch in Verbindung mit anderen Proteinen einen weitaus geringeren Effekt auf die Translokationseffizienz der Proteine. Des Weiteren zeigten Heggeset *et al.* (2013), dass durch herbeigeführte Mutationen in der zuvor erzeugten Consensus-Signal-Sequenz, die Translokationseffizienz sowohl der  $\beta$ -Laktamase als auch anderer Proteine, wie die der alkalischen Phosphatase PhoA aus *E. coli*, um ein Vielfaches steigern konnte. Die Generierung einer solchen Consensus-Signal-Sequenz für *G. oxydans* könnte ebenfalls zu einer Verbesserung der Translokation von heterolog produzierten, periplasmatischen Proteinen führen. Für die heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli* sind einige Signalpeptide beschrieben, die universell einsetzbar sind und eine meist moderate Translokationseffizienz der produzierten Proteine bewirken. Hierzu gehören die Signalsequenzen *pelB* und *ompA*. Bei der *pelB*-Sequenz handelt es sich um das Signalpeptid einer Pectat-Lyase aus dem Organismus *E. carotovora* und OmpA ist ein aus *E. coli* stammendes Protein der äußeren Membran. Studien von Kosciow *et al.* (2014) zeigten, dass bei der Produktion der Phosphatase PhoA in *G. oxydans* 621H, unter Verwendung unterschiedlicher Signalsequenzen, das *pelB* Signalpeptid sowohl in *E. coli*, als auch in *G. oxydans* eine hohe Translokationseffizienz besitzt. Eine weitere Signalsequenz, die innerhalb dieser Studie untersucht wurde und eine ebenso effiziente Translokation der

alkalischen Phosphatase bewirkte, war das Signalpeptid SP2219 aus *G. oxydans* 621H. Bei SP2219 handelt es sich um das Signalpeptid eines Ribose ABC-Transporters aus *G. oxydans* 621H. Basierend auf den von Kosciow *et al.* (2014) erzielten Ergebnissen wurden die Signalsequenzen *pelB* und SP2219 zum Austausch des nativen Signalpeptids von Acry1741 ausgewählt, um eine Steigerung der Translokationseffizienz der putativen Alkohol-Dehydrogenase Acry1741 aus *A. cryptum* JF-5 in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hdsR* zu erzielen.

Die Klonierung der Expressionsplasmide zur Produktion von Acry1741 als Fusionsprotein mit der *pelB*- und der SP2219-Signalsequenz waren erfolgreich. Bei einer anschließenden Überproduktion von Acry1741 in der *G. oxydans* Deletionsmutante BP.9 konnte jedoch kein Protein detektiert werden. Diese Beobachtung führt zu der Hypothese, dass die ausgewählten Signalsequenzen in Verbindung mit der Nukleotidsequenz des Gens *acry1741* nicht, oder nur in sehr geringen Mengen, translatiert werden. Grund dafür kann die Ausbildung neuer Sekundärstrukturen der mRNA sein, basierend auf der Änderung der Nukleotidsequenz durch die Fusion mit den Signalsequenzen (Vgl. Kap. 3.2.8). Durch die Ausbildung besonders starker Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA kann es zu einer Inhibierung der Translation der Nukleotidsequenz kommen, wenn beispielsweise der Zugang zur Ribosombindestelle am 5'-Ende der RNA blockiert wird oder Sekundärstrukturen die Elongation während der Proteinsynthese verlangsamen (Bentele *et al.*, 2013; Bonde *et al.*, 2016). Die Stabilität solcher Sekundärstrukturen, wie Haarnadelstrukturen oder Schleifen, hängt von der freien Energie ( $\Delta G$ ) der Struktur ab. Die Stabilität einer Nukleotidstruktur wird durch die auftretenden Basenpaarungen und deren Umgebung bedingt, die sich bei der Faltung der Nukleotidsequenz ergeben (Zhao *et al.*, 2016; Bentele *et al.*, 2013). De Smit und van Duin (1990) zeigten, dass eine direkte Korrelation zwischen der Stabilität einer RNA-Sekundärstruktur und der Translationsinitiationsrate besteht. So kann die Verringerung der freien Energie um -1,4 kcal/mol die Initiationsrate um ein Zehnfaches reduzieren. Einen besonders starken Einfluss auf die Translationseffizienz haben dabei Sekundärstrukturen der mRNA, die im Bereich um das Initiations-Codon liegen (Seo *et al.*, 2013; Kudla *et al.*, 2009). Die Translationseffizienz beschreibt das Verhältnis von Protein- zu mRNA-Menge, also die Menge Protein, die durch ein Molekül mRNA produziert wird (Tuller *et al.*, 2010). Sollte durch die Fusion der Signalsequenzen *pelB* und SP2219 mit der Nukleotidsequenz von *acry1741* eine erhöhte Stabilität der Sekundärstruktur der mRNA entstanden sein, könnte das erheblichen Einfluss auf die Translation der Nukleotidsequenz und somit auf die Proteinproduktion haben. Hierzu wurden die Sekundärstrukturen der Nukleotidsequenzen des Gens *acry1741* mit nativer *pelB*- und SP2219-Signalsequenz im Bereich -6 bis +45 ausgehend

vom Startcodon mit Hilfe des Programms Mfold (Rensselaer Polytechnic Institute, State University of New York at Albany; <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) untersucht. Aus der Modellierung wurde ersichtlich, dass deutliche strukturelle, sowie energetische Unterschiede innerhalb der RNA-Strukturen zu erkennen waren (Abb. 40). Die ersten 13 Basen aller drei Strukturen lagen laut bioinformatischer Analyse frei vor. Des Weiteren wiesen alle mRNA-Sequenzen eine Haarnadelstruktur auf, die bei den Sequenzen mit der nativen, sowie mit der SP2219-Signalsequenz in einem doppelten Ring und bei der pelB-Fusionssequenz in einem kleinen Ring endeten. Die freie Energie  $\Delta G$  betrug für die native Sequenz -4,1 kcal/mol, für die SP2219-Fusionssequenz -9 kcal/mol und für die pelB-Fusionssequenz -10,5 kcal/mol.



**Abbildung 40:** Analyse der Nukleotidsequenzen des Gens *acry1741* mit nativer pelB- und SP2219-Signalsequenz im Bereich -6 bis +45 ausgehend vom Startcodon mit Hilfe des Programms Mfold. Links: RNA-Sekundärstruktur des Gens *acry1741* mit nativer Signalsequenz. Die freie Energie  $\Delta G$  der Struktur lag bei -4,1 kcal/mol. Mitte: RNA-Sekundärstruktur des Gens *acry1741* mit pelB-Signalsequenz. Die freie Energie  $\Delta G$  der Struktur lag bei -9 kcal/mol. Rechts: RNA-Sekundärstruktur des Gens *acry1741* mit SP2219-Signalsequenz. Die freie Energie  $\Delta G$  der Struktur lag bei -10,5 kcal/mol.

Die Sekundärstrukturen der Sequenzen mit den ausgetauschten Signalsequenzen besaßen somit eine mehr als doppelt so hohe freie Energie, als die Struktur der nativen mRNA-Sequenz. Die Erhöhung der Stabilität der mRNA-Sekundärstrukturen könnte eine Erklärung für die nicht erfolgte Translation der Fusionsproteine SP2219Acry1714 und pelBAcry1741 sein. Da alle Proteinproduktionen mit Expressionsplasmiden durchgeführt wurden, die dasselbe Vektorgerüst besaßen, waren auch die Shine-Dalgarno-Sequenzen in allen Plasmiden gleich, sodass Unterschiede in der Translationseffizienz der Gene nicht auf Affinitätsunterschiede zwischen Ribosom und Ribosombindestelle zurückgeführt werden können. Bei Vorhersagen zur Translationsrate basierend auf einer RNA-Sekundärstruktur muss jedoch angemerkt werden, dass es sich bei diesen Strukturen nicht um starre Gebilde



handelt, sondern Strukturen sich während des Translationsprozesses verändern können, was eine genaue Vorhersage bezüglich der Translationseffizienz erschwert. Zudem muss berücksichtigt werden, dass Ribosomen nicht immer eine direkte Bindung mit dem Shine-Dalgarno-Motiv eingehen, sondern oftmals auch oberhalb der Ribosombindestelle an einer energetisch günstigeren Position an die mRNA anlagern und dann die mRNA entlang zur Shine-Dalgarno-Sequenz gleiten um dort die Translation zu initiieren (De Smit und van Duin, 1994; Seo *et al.*, 2013). Somit ist die Translationsinitiationsrate, neben der Zugänglichkeit der mRNA für die 30S-Untereinheit des Ribosoms, auch von der Bindeaffinität der 16S rRNA zur Shine-Dalgarno-Sequenz, sowie von der physischen Distanz von Ribosombindestelle und Start-Codon abhängig (Shine und Dalgarno, 1975; Seo *et al.*, 2013). Berechnet man das Expressionslevel mit dem von Seo *et al.* (2013) verwendeten Analyse-Programm UTR-Designer, das all diese Komponenten (Sekundärstruktur,  $\Delta G$ , Distanz von Ribosombindestelle zum Start-Codon, Affinität von Ribosom zur Initiationsstelle) berücksichtigt, lagen die vorhergesagten Translationslevel des Gens *acry1741* mit der SP2219- und der pelB-Signalsequenz um das sechs- und um das 570-fache höher als bei einer Expression des Gens mit nativer Signalsequenz. Somit widerspricht diese, mit dem UTR-Designer durchgeführte, Berechnung der Vorhersage zur RNA-Strukturausbildung, die mit Hilfe des Programms Mfold angefertigt wurde. Da bei Versuchen zur Proteinproduktion von Acry1741 mit den Signalpeptiden SP2219 und pelB jedoch kein Protein detektiert werden konnte, scheinen die Vorhersagen zum Translationslevel entweder nichtzutreffend, oder die Inhibierung bzw. der Auslöser für die nicht erfolgte Proteinproduktion liegt auf Expressionsebene. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Programme, die zur Vorhersage von Expressions- und Translationslevel bestimmter Gene bzw. Proteine eingesetzt werden, meist auf Studien basieren, bei denen die Expression oder Translation in *E. coli* untersucht wurde. Dies bedeutet, dass Vorhersagen bezüglich eines Expressions- oder Translationslevels in *E. coli* für andere Organismen nicht zwangsläufig zutreffend sind.

In *E. coli* konnte beobachtet werden, dass nicht gefaltete Proteine, oder für die Zelle toxische Proteine, entweder in Einschlusskörperchen gelagert, oder von cytoplasmatischen Proteasen abgebaut werden (Georgiou und Valax, 1996; Hannig und Makrides, 1998; Sørensen und Mortensen, 2005). Einschlusskörperchen sind strukturell hoch komplexe Aggregate mit einer Proteinkonzentration von 200–300 mg/ml, die häufig als Stressantwort zum Beispiel bei der Überproduktion heterologer Proteine im Cytoplasma gebildet werden (Van der Berg *et al.*, 1999). Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Einschlusskörperchen hängt unter anderem von der Expressionsstärke des verwendeten Expressionssystems sowie von der

Komplexität bzw. Beschaffenheit der exprimierten Proteine ab. Je stärker der gewählte Promotor ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von fehlgefalteten, oder unvollständig produzierten Proteinen. Des Weiteren kann die Produktion von Proteinen mit komplexen intrazellulären Bindungen, wie Disulfidbrücken, zu Problemen in der Proteinproduktion führen (Sørensen und Mortensen, 2005; Baneyx und Mujacic, 2004). Der Abbau fehlgefalteter Proteine wird hingegen durch ATP-abhängige Proteasen initiiert, wie die Lon-, ClpYQ/HslUV-, ClpAP, ClpXP oder FtsH-Protease und von Peptidasen, die kurze Aminosäuresequenzen hydrolysieren, ergänzt (Baneyx und Mujacic, 2004). Dementsprechend kann die nicht erfolgte Produktion heterologer Dehydrogenasen in *G. oxydans* in der Bildung von Einschlusskörperchen oder in der schnellen Degradierung nicht gefalteter Proteine durch Proteasen begründet liegen. Die Bildung von Einschlusskörperchen in *G. oxydans* wurde mittels Western Blot analysiert, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten), sodass ein schneller Abbau fehlgefalteter Proteine durch cytoplasmatische Proteasen wahrscheinlicher ist. Blastp-Analysen zeigten, dass *G. oxydans* Proteine besitzt, die Homologien zu den in *E. coli* charakterisierten Proteasen Lon und ClpXP aufweisen. Die Proteasen Lon und ClpXP werden in *G. oxydans* von den Genen *gox0085 (lon)*, *gox0086 (clpX)* und *gox0087(clpP)* kodiert und sind in einem Operon organisiert. Bei Versuchen zur Generierung von Deletionsmutanten, bei denen entweder das für die Lon-Protease kodierende Gen *gox0085*, oder das gesamte Operon *gox0085-gox0087* deletiert werden sollte, konnten keine Kolonien identifiziert werden, die eine Deletion aufwiesen (nicht gezeigte Daten). Dass alle untersuchten Kolonien nach erfolgter Rekombination den Genotyp des Wildtyps aufwiesen, deutet darauf hin, dass die Proteasen in *G. oxydans* essentielle Proteine darstellen.

Neben Translationsrate, struktureller Beschaffenheit der mRNA und schnellem proteolytischem Abbau Organismus-fremder Proteine, kann auch die Kodierung der Aminosäuresequenz eines Proteins, die sogenannte „Codon-Usage“ Einfluss auf den Erfolg einer Proteinproduktion nehmen. Unter dem Begriff „Codon-Usage“ versteht man den verstärkten bzw. bevorzugten Gebrauch verschiedener für bestimmte Aminosäuren kodierender Nukleotid-Triplets, der je nach Organismus variieren kann (Terpe, 2006). Die meisten Aminosäuren werden von mehr als einem Nukleotid-Triplet kodiert und der Gebrauch bevorzugter Kodierungs-Triplets unterscheidet sich stark innerhalb der verschiedenen Bakterien-Spezies. Demnach synthetisieren Bakterien die tRNA, von nur selten verwendeten Triplets, in geringen Mengen und die, zu den häufig verwendeten Kodierungen korrespondierenden, tRNA-Moleküle verstärkt (Dong *et al.*, 1996). Enthält die Aminosäuresequenz eines heterolog zu produzierenden Proteins viele Kodierungen, die vom

Expressionsstamm nur selten verwendet werden, kann es zu einem Mangel an bestimmten tRNA-Molekülen kommen, was zur Inhibierung, oder zum Abbruch der Translation, sowie zur Verschiebung des Leserasters führen kann (Terpe, 2006; Baneyx und Mujacic, 2004). Kudla *et al.* (2009) zeigten zudem, dass nicht ausschließlich die Verwendung bestimmter, vom Expressionsorganismus bevorzugter Codons für die Translationseffizienz verantwortlich ist, sondern die Sekundärstruktur der mRNA am 5'-Ende die Translationsinitiation und somit auch die Translationseffizienz stark beeinflusst. Der Gebrauch von bestimmten Codons spielt zwar auch in die Translationseffizienz hinein, ist jedoch als eine generelle Optimierung des Translationsprozesses anzusehen, die nicht genspezifisch ist und sich durch evolutionäre Selektion herausgebildet hat. Die Theorie wird von weiteren Studien unterstützt, die zeigten, dass in Signalsequenzen oft eine hohe Anzahl an bestimmten Codons zu finden ist. Darunter befinden sich oft auch so genannte seltene Codons, die sonst vom Organismus selten verwendet werden. Das Einfügen solcher seltenen Codons im 5'-Ende einer Nukleotidsequenz kann zu einer Steigerung der Translationsinitiationsrate führen (Goodman *et al.*, 2013; Pop *et al.*, 2014; Power *et al.*, 2004; Zalucki *et al.*, 2007). Zudem konnten Kudla *et al.* (2009) zeigen, dass die Faltung der RNA im Bereich -4 bis +37 ausgehend vom Startcodon der Nukleotidsequenz die Translationseffizienz stärker beeinflusst, als die Faltung der mRNA im Bereich der Shine Dalgarno Sequenz, der eigentlichen Bindestelle des Ribosoms. Je niedriger das  $\Delta G$  in dem Bereich -4 bis +37 ist, desto stärker ist die Translation der Nukleotidsequenz. Um die Translation eines Gens zu erhöhen, müssten die Codons der Nukleotidsequenz des Gens so angepasst werden, dass keine Veränderung der späteren Aminosäuresequenz bewirkt wird, jedoch schwächere Basenpaarungen in der Sekundärstruktur der mRNA entstehen. Zusätzlich könnte das Einfügen eines von *G. oxydans* selten verwendeten Codons die Translationsinitiation steigern (Goodman *et al.*, 2013).

Da, nach Austausch der Signalsequenz des Gens *acry1741* durch die Sequenzen der Signalpeptide *pelB* und *SP2219* keine Proteinproduktion nachgewiesen werden konnte (Vgl. Kap. 3.2.8), bleibt unklar, ob die alternativ eingesetzten Signalsequenzen zu einer Steigerung der Translokationseffizienz von *Acry1741* hätten führen können. Die Vorhersage eines geeigneten Signalpeptids für ein Protein ist nicht möglich, sodass für jedes Protein individuell experimentell ein geeignetes Signalpeptid identifiziert werden muss. *G. oxydans* verfügt über zwei zum *OmpA*-Protein aus *E. coli* homologe Bindeproteine der äußeren Membran, die von den Genen *gox1688* und *gox2112* kodiert werden. Da die Translokationseffizienz in *E. coli* bei einer Proteinproduktion mit *ompA* als Signalsequenz hoch ist (Denèfle *et al.*, 1989; Takahara *et al.*, 1984), könnte die Produktion von Proteinen mit den Signalpeptidsequenzen

von *gox1688* und *gox2112* in *G. oxydans* ebenfalls zu einem erhöhten Transport der Proteine ins Periplasma führen (Hockney, 1994; Hannig und Makrides, 1998; Mergulhão *et al.*, 2005). Der Austausch der nativen Signalsequenz von *acry1741* durch die Signalsequenzen der Gene *gox1688* und *gox2112* wäre somit ein alternativer Ansatz zur Steigerung sowohl der Translations- als auch der Translokationseffizienz von Acry1741 und anderer periplasmatischer Dehydrogenasen in *G. oxydans*. Der Austausch der nativen Signalpeptide periplasmatischer Dehydrogenasen durch ein Tat-Signalpeptid wäre außerdem ein weiterer Ansatz, der in *E. coli* bereits zur Produktion nicht cytoplasmatischer Enzyme genutzt wird (Choi und Lee, 2004; Terpe, 2006; Thomas *et al.*, 2001). Der Einsatz dieser Strategie zur Produktion PQQ-abhängiger Dehydrogenasen in *G. oxydans* ist bisher nicht tiefgreifend untersucht, da die Faltung PQQ-abhängiger Enzyme und Einbindung der prosthetischen Gruppe PQQ ins Protein im Periplasma erfolgt. Bei einem Transport über das Tat-abhängige Transportsystem läuft die Faltung der Proteine jedoch im Cytoplasma ab und das Protein wird im Teil-gefalteten Zustand über die cytoplasmatische Membran transportiert. Inwiefern eine anschließende Rekonstitution des teilgefalteten Proteins mit PQQ noch möglich ist, müsste experimentell ermittelt werden.

### **4.3 Produktion membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans*-Stämmen**

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Produktion membranständiger Dehydrogenasen. Zunächst wurden mittels Blastp-Analysen sechs PQQ-abhängige, nicht charakterisierte Enzyme aus verschiedenen Organismen für die Produktion und Charakterisierung in *G. oxydans*-Stämmen ausgewählt (Vgl. Kap. 3.3.2 und Kap. 3.3.3). Des Weiteren sollte das membranständige, als Inositol-Dehydrogenase annotierte, Enzym Gox1857 aufgereinigt und beschrieben werden. Durch die erfolgreiche Produktion des bereits beschriebenen, membranständigen Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes aus *G. japonicus* (Ameyama *et al.*, 1981; Kawai *et al.*, 2013), konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das ausgewählte Expressionssystem für die Produktion membranständiger Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* geeignet ist. Eine detailliertere Betrachtung des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes erfolgt in Kapitel 4.4.1.

#### **4.3.1 Produktion der membranständigen Dehydrogenasen Gdi3764 und Gox1857**

Wie in Kapitel 3.2.4 gezeigt werden konnte, erwies sich der Stamm *G. oxydans* BP.9 als geeigneter für die Produktion cytoplasmatischer und periplasmatischer Dehydrogenasen verglichen mit dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*. Diese Beobachtung konnte ebenfalls für die Produktion membranständiger Enzyme gemacht werden (Vgl. Kap. 3.3.3). Von den sechs

nicht charakterisierten Dehydrogenasen konnte das Protein Gdi3764 aus *G. diazotrophicus*, welches als putative Sorbosen-Dehydrogenase annotiert war, sowie das als Inositol-Dehydrogenase annotierte (Hölscher *et al.*, 2007) Enzym Gox1857 in *G. oxydans* BP.9 produziert und aufgereinigt werden. Die Produktion beider Proteine konnte mit Hilfe eines spezifischen Streptactin-Konjugates nachgewiesen werden (Abb. 11).

L-Sorbosen-Dehydrogenasen werden bei der Synthese von L-Ascorbinsäure (Vitamin C) eingesetzt und bilden eine Enzymgruppe, die äußerst interessant für die Weiterentwicklung industrieller Prozesse zur Vitamin C-Gewinnung ist. Vitamin C wurde erstmals 1928 isoliert und bildet heute mit einer jährlichen Produktion von > 100.000 t/Jahr und einem Marktpreis von 10 USD/kg ein wirtschaftlich bedeutendes Präparat. Die jährliche Produktion von Vitamin C wird auch weiterhin, aufgrund des zunehmenden Gesundheitsbewusstseins und dem damit korrelierenden Bedarf an Nahrungsergänzungsmitteln in der Gesellschaft, wachsen (Svirbely und Szent-Györgyi, 1932; Pappenberger und Hohmann, 2014). Da dem Menschen das Enzym L-Gulon-1,4-Lacton-Oxidase fehlt, das den letzten Schritt in der Vitamin C-Synthese katalysiert, ist der menschliche Organismus im Gegensatz zu den meisten Tieren und Pflanzen nicht in der Lage L-Ascorbinsäure zu synthetisieren (Chatterjee, 1973). Da diese Verbindung jedoch essentiell für den menschlichen Metabolismus ist, muss Vitamin C über die Nahrung oder über Nahrungsergänzungsmittel aufgenommen werden (Bremus *et al.*, 2006). L-Ascorbinsäure kann aufgrund seines Konjugationssystems Elektronen abgeben und somit als Reduktionsmittel fungieren, was das Vitamin zu einem zentralen Bestandteil einiger wichtiger Redoxprozesse macht (Mandl *et al.*, 2009). So spielt L-Ascorbinsäure beispielsweise bei der Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in Mitochondrien eine tragende Rolle und fungiert als Redox-Co-Faktor wichtiger Mono- und Di-Oxygenasen, welche in Hydroxylierungsprozesse involviert sind. Solche Mono- und Di-Oxygenasen sind beispielsweise in der Generierung von Carnitin, das eine bedeutende Rolle im Fettsäurestoffwechsel besitzt, von dem Botenstoff Noradrenalin oder von 4-Hydroxy-Prolin, welches Bestandteil des Kollagens der menschlichen Haut ist, involviert und werden industriell genutzt (Pappenberger und Hohmann, 2014). Neben der Lebensmittelindustrie werden große Mengen an Vitamin C in der Kosmetik- und Pharmaindustrie eingesetzt. So enthalten beispielsweise Anti-Falten-Cremes und andere Hautpflegeprodukte oft Vitamin C. Des Weiteren fungiert L-Ascorbinsäure oft als Antioxidans in vielen Medikamenten wie dem Erkältungsmedikament Grippostad C oder in Medikamenten die bei Depressionen oder anderen das Nervensystem betreffenden Krankheiten eingesetzt werden (Moretti *et al.*, 2012; Koytchev *et al.*, 2003; Rona *et al.*, 2004; Shapiro und Saliou, 2001; Pappenberger und

Hohmann, 2014). Die erste Methode zur Synthese von Vitamin C wurde 1933 von Reichstein und Grüssner entwickelt. Die Reichstein-Synthese, bei der D-Glukose zu L-Ascorbinsäure umgesetzt wird, setzt sich aus einer bakteriellen Oxidation und verschiedenen chemischen Syntheseschritten zusammen. D-Glukose wird zunächst chemisch mittels katalytischer Hydrierung zu D-Sorbitol umgesetzt, welches anschließend von *Gluconobacter*-Spezies weiter zu L-Sorbose oxidiert wird. Es erfolgt im Anschluss eine chemische Umsetzung der L-Sorbose über 2-Keto-Gulonsäure als Intermediat zu L-Ascorbinsäure (Reichstein und Grüssner, 1934). Diese Art der Vitamin C-Synthese wurde über 35 Jahre durchgeführt bis 1970 in China eine Weiterentwicklung des Syntheseverfahrens erfolgte, die die klassische Reichstein-Synthese ersetzte (Yin *et al.*, 1980). In diesem neuen Verfahren wird die Umwandlung von L-Sorbose zu 2-Keto-Gulonsäure nicht mehr chemisch, sondern durch Einsatz von Mikroorganismen durchgeführt. Dabei wird L-Sorbose durch eine Co-Kultur aus *Ketogulonicigenium vulgare* und einem *Bacillus*-Stamm direkt zu 2-Keto-Gulonsäure umgewandelt. *K. vulgare* besitzt sowohl eine Sorbose-, als auch eine Sorboson-Dehydrogenase, welche die Umsetzung von Sorbose zu Sorboson und von Sorboson zu 2-Keto-Gulonsäure katalysieren. Die Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose erfolgt weiterhin mit *Gluconobacter*-Spezies, da *Gluconobacter* eine Umwandlungseffizienz von fast 100 % aufweist und kein anderes Essigsäurebakterium diesen Oxidationsvorgang so effizient durchführen kann (Vandamme und Revuelta, 2016; Jing *et al.*, 2009). Das neu etablierte Syntheseverfahren ist günstiger und ökologisch verträglicher als die chemische Synthese, da der Einsatz von sowohl teuren, als auch gesundheits- und umweltschädlichen Chemikalien entfällt. Neben den zwei vorgestellten Syntheseverfahren gibt es weitere Methoden Vitamin C zu synthetisieren, jedoch sind diese wenig effizient und deswegen nicht industriell etabliert (Vandamme und Revuelta, 2016). Beispielsweise kann durch den Einsatz von Mischkulturen aus *Erwinia*-Spezies und *Corynebakterium*-Spezies D-Glukose über 2,5-Diketo-D-Gulonsäure zu 2-Keto-Gulonsäure umgewandelt werden und *Gluconobacter melanogenus* produziert 2-Ketogulonsäure direkt aus L-Sorbose, jedoch lediglich in geringen Mengen (Sonoyama *et al.*, 1982; Pappenberger und Hohmann, 2014). Innerhalb der letzten Jahre wurden viele Studien durchgeführt, um eine Steigerung der 2-Keto-Gulonsäure-Produktion und damit korrespondierend auch eine indirekte Steigerung der Vitamin C-Produktion zu erreichen, da 2-Keto-Gulonsäure die direkte Vorstufe von L-Ascorbinsäure ist. Du *et al.* (2013) konnten die Produktion von 2-Keto-Gulonsäure deutlich steigern, indem sie die Gene der Sorbitol- und Sorboson-Dehydrogenasen, sowie die für die Synthese von PQQ notwendigen Gensequenzen, in *K. vulgare* homolog überexprimierten. Diese Überexpression resultierte in einer deutlichen

Steigerung der Produktionsraten der korrespondierenden Enzyme im Produktionsstamm. Diese Stammoptimierung führte zu einer Umsetzung von 80 g/l L-Sorbose zu 65 g/l 2-Keto-Gulonsäure. Dies entspricht einer Produktionssteigerung um etwa 20 % im Vergleich zu bestehende Verfahren (Du *et al.*, 2013). Da 2-Keto-Gulonsäure in Konzentrationen >100 g/l toxisch für die Co-Kultur aus *K. vulgare* und *Bacillus* sp. ist, scheint das System eine deutliche Limitierung aufzuweisen. Ein alternativer Ansatz zur Steigerung der 2-Keto-Gulonsäureproduktion wäre die Generierung eines *G. oxydans*-Stammes, der in der Lage ist D-Sorbitol zu 2-Keto-Gulonsäure umzusetzen. Dieser Ansatz besäße gegenüber der genetischen Modifikation von *K. vulgare* einige Vorteile. Durch die Reduzierung des Syntheseverfahrens auf einen einzelnen Mikroorganismus würde die Sterilisierung des Produktionsansatzes nach Umsatz des D-Sorbitol zu L-Sorbose entfallen. Außerdem zeigt *G. oxydans* eine um 40 % gesteigerte Toleranz gegenüber 2-Keto-Gulonsäure im Vergleich mit dem 2-Stamm-System, bestehend aus *K. vulgare* und *Bacillus* sp. (Gao *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2013). Eine Vielzahl an Studien zur Generierung eines solchen *G. oxydans*-Stammes wurde bereits durchgeführt. Gao *et al.* (2014) beispielsweise exprimierten die korrespondierenden Gene eines Fusionsproteins, bestehend aus der Sorbose- und der Sorboson-Dehydrogenase aus *K. vulgare*, in *G. oxydans* WSH-003 und ermöglichten somit die direkte Umsetzung von D-Sorbitol zu 2-Keto-Gulonsäure durch einen Bakterienstamm. Die Ausbeute an produzierter 2-Keto-Gulonsäure in einem Zeitraum von 72 h betrug bei diesen Experimenten 39,2 g/l und lag deutlich unter der Ausbeute von 100 g/l innerhalb von ca. 40 h, welche durch eine Synthese mit Hilfe des Zwei-Stamm-Systems erlangt werden konnte (Pappenberger und Hohmann, 2014). Somit war eine Etablierung der Synthese von 2-Keto-Gulonsäure aus D-Sorbitol durch den gentechnisch modifizierten *G. oxydans*-Stamm bisher aus wirtschaftlicher Sicht nicht rentabel. Dementsprechend ist es von großem industriellem Interesse, neue Sorbose- und Sorboson-Dehydrogenasen zu identifizieren und zu charakterisieren, die die Umwandlung von L-Sorbose zu 2-Keto-Gulonsäure schneller und effizienter katalysieren als bekannte Enzyme und diese in der Vitamin C-Synthese zu etablieren. Da es sich bei den Proteinen Gdi3764 und Gox1857 um potentielle Sorboson-Dehydrogenasen handelt, könnte die Produktion der Proteine in *G. oxydans* ein erster wichtiger Schritt zur Generierung eines neuen Stammes darstellen, der die direkte Produktion von 2-Keto-Gulonsäure aus D-Sorbitol ermöglicht.

Die putative Sorboson-Dehydrogenase Gdi3764 aus *G. diazotrophicus* weist, basierend auf Angaben der Datenbank Interpro, eine C-terminale Propeller-Struktur auf, welche aus sechs vier-strängigen  $\beta$ -Faltblättern besteht. Diese Proteinstruktur konnte unter anderem bei TolB-

ähnlichen Proteinen, bei PQQ-abhängigen, löslichen Glukose-Dehydrogenasen wie der Glukose-Dehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* (Klasse II der PQQ-abhängigen Enzyme) und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phosphotriesterasen identifiziert werden. Annotiert ist die Dehydrogenase als Glukose-/Sorboson-Dehydrogenase und Blastp-Analysen zeigten eine Identität von 78,8 % bei einer Sequenzabdeckung von 85,1 % mit der Aminosäuresequenz einer Sorboson-Dehydrogenase aus *Gluconacetobacter liquefasciens*. Auch konnte eine Identität von 74,7 % bei einer Abdeckung der Sequenzen von 83,9 % mit einer Sorboson-Dehydrogenase aus *Komagataeibacter europaeus* nachgewiesen werden. Das Protein Gdi3764 konnte erfolgreich in der Mutante *G. oxydans* BP.9 produziert und aufgereinigt werden. Der Western Blot von Gdi3764 zeigte eine Proteinbande von 71,3 kDa, was von dem bioinformatisch errechneten Molekulargewicht von 53,4 kDa abwich. Ein Grund für die abweichende Proteingröße könnte der Einfluss des Detergenz, in dem Gdi3764 solubilisiert war, auf das Laufverhalten des Proteins sein. Rath *et al.* (2009) zeigten, dass Detergenzien das Laufverhalten von Membranproteinen stark beeinflussen und sowohl zu einer verringerten, als auch vergrößerten Laufdistanz der Proteine bei einer elektrophoretischen Auftrennung führen können. Bioinformatische Vorhersagen bezüglich der Lokalisierung des Proteins Gdi3764 waren nicht eindeutig. Die Programme SignalP und TMHMM zeigten eine N-terminal gelegene Transmembranhelix an, über welche das Enzym in der cytoplasmatischen Membran verankert sein könnte und das Programm Phobius ermittelte ein Signalpeptid zur Translokation in den periplasmatischen Raum. Da das Protein Gdi3764 aus der löslichen Fraktion nach erfolgtem Zellaufschluss isoliert wurde, konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesem Enzym tatsächlich um eine periplasmatische Dehydrogenase handelt. Bei anschließenden Aktivitätstests mit dem Protein Gdi3764 konnte weder mit Sorboson als Substrat, noch mit verschiedenen anderen Zuckern, Alkoholen, Diolen, Aldehyden und Aminosäuren eine Aktivität detektiert werden (Vgl. Kap. 3.3.3). Auch nach einer *in vitro* Rekonstitution des Proteins mit  $\text{Ca}^{2+}$  und PQQ zeigte das Enzym keine Aktivität. Des Weiteren wurden Enzymaktivitätstests mit intakten Zellen durchgeführt, um potentielle Unterschiede in der Substratumsetzung der BP.9-Mutante zu detektieren. Auch die Aktivitätsmessungen mit intakten Zellen konnten keinen Hinweis auf die Funktionalität der putativen Sorboson-Dehydrogenase Gdi3764 liefern. Da es sich bei dem Protein um eine periplasmatische Dehydrogenase handelt, ist anzunehmen, dass auch hier wie bei den anderen untersuchten periplasmatischen Dehydrogenasen eine nicht erfolgte Translokation des Proteins zu dessen Inaktivität geführt hat.



Das membranständige Protein Gox1857 ist als PQQ-abhängige Dehydrogenase annotiert und Studien mit *G. oxydans*-Deletionsmutanten, bei denen das Gen *gox1857* deletiert wurde, gaben Hinweise darauf, dass es sich bei dem Enzym Gox1857 um eine Inositol-Dehydrogenase handelt (Hölscher *et al.*, 2007, Mientus *et al.*, 2017). Eine Charakterisierung am aufgereinigten Protein, die diese Funktion bestätigen könnte, ist jedoch bisher nicht erfolgt. Im Gegensatz dazu deuteten Untersuchungen von Beuzelin-Olivier *et al.* (2012) und Berry *et al.* (2012), darauf hin, dass es sich bei der membranständigen Dehydrogenase Gox1857 um eine L-Sorboson-Dehydrogenase handeln könnte, da die Aminosäuresequenz von Gox1857 eine 99 %-ige Übereinstimmung zu einer patentierten Sorboson-Dehydrogenase aus *G. oxydans* IFO3293 (früher *G. melanogenus* IFO 3293; Sugisawa *et al.*, 1990) aufweist. Weitere experimentelle Analysen zur Funktion der potentiellen Sorboson-Dehydrogenase Gox1857 bestätigten, dass Gox1857 Sorboson entweder zu 2-Keto-Gulonsäure oder direkt zu Ascorbinsäure umsetzen kann (persönliche Mitteilung Prof. U. Deppenmeier, Universität Bonn). Eine ausführliche Charakterisierung der membranständigen Dehydrogenase Gox1857 am aufgereinigten Enzym ist somit von großem Interesse in Hinblick auf eine industrielle Anwendung in der Vitamin C-Produktion. Blastp-Analysen zeigten, dass Gox1857 eine Identität von 99,9 % sowie eine Sequenzabdeckung von 99,9 % zu einem als Quinat/Shikimat-Dehydrogenase annotierten Protein aus *G. oxydans* DSM 3504 besitzt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Gox1857 eine Identität von 59,6% sowie eine Sequenzabdeckung von 73,2 % mit einer putativen Shikimat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* aufweist. Die Datenbank Interpro ordnet Gox1857 in die Proteinfamilie der Alkohol-Dehydrogenasen ein. Da Sorboson-Dehydrogenasen große Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu Glukose-, Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen aufweisen, tritt eine falsche funktionelle Einordnung dieser Proteine basierend aus Sequenzvergleichen häufig auf (Saito *et al.*, 1997). Laut Datenbankanalysen mit den Programmen Phobius und TMHMM ist Gox1857 über fünf Transmembranhelices in die cytoplasmatische Membran integriert. Der Proteinbereich, der ins Periplasma ragt, besitzt laut Datenbankanalysen eine  $\beta$ -Propeller-Struktur bestehend aus acht  $\beta$ -Faltblättern (Klasse I der Chinoproteine). Der spezifische Nachweis des in dieser Arbeit produzierten Proteins mittels Western Blot zeigte eine Bande von 84,7 kDa, was mit der vorhergesagten Proteingröße von 84,5 kDa übereinstimmte. Enzymaktivitätstests wurden mit verschiedenen Substratklassen durchgeführt, jedoch konnte keine Aktivität detektiert werden. Auch mit myo-Inositol und Sorboson zeigte das Enzym keine Aktivität, sodass die Funktion von Gox1857 als Inositol- oder Sorboson-Dehydrogenase nicht bestätigt werden konnte. Da mit keinem Substrat eine Aktivität des Enzyms detektiert

wurde, konnte nicht differenziert werden, ob die nicht erfolgte Umsetzung von myo-Inositol bzw. Sorboson durch Gox1857 auf die Auswahl nicht passender Substrate beruhte, oder auf eine Inaktivität des Enzyms zurückzuführen war. Durch den Solubilisierungsprozess von Proteinen aus der Membran können Tertiärstrukturen verändert werden, was die Aktivität des Proteins beeinflussen kann (Opekarová und Tanner, 2003). Da Gox1857 fünffach die Membran durchspannt, steht ein Großteil des Proteins in Interaktion mit der cytoplasmatischen Membran, was die Stabilität und strukturelle Integrität des Proteins maßgeblich beeinflusst. Das Herauslösen des Proteins aus der cytoplasmatischen Membran kann eine Veränderung der Proteinstruktur bewirken, und dadurch zu dessen Inaktivierung geführt haben. Dass die Inaktivität des Proteins auf einer fehlerhaften Integration des Enzyms in die Membran beruht, ist hingegen eher unwahrscheinlich, da es sich um ein nativ aus *G. oxydans* stammendes Protein handelt und der Organismus zur Synthese und zum korrekten Einbau des Proteins befähigt sein sollte. Zusätzlich zu den Aktivitätstests am aufgereinigten Enzym, wurden Aktivitätstests an Membranen sowie an intakten Zellen durchgeführt. Somit wurde gewährleistet, dass das Protein unter den benötigten physiologischen Bedingungen seiner natürlichen Umgebung agieren konnte. Der Substratumsatz der BP.9-Mutante, die *gox1857* auf einem Expressionsplasmid trug, zeigte keine Unterschiede im Vergleich zum Substratumsatz der BP.9-Mutante ohne Expressionsplasmid (Abb. 12). Somit konnte innerhalb dieser Arbeit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, dass es sich bei Gox1857 tatsächlich um eine Inositol- oder eine Sorboson-Dehydrogenase handelt.

#### **4.3.2 Charakterisierung der membranständigen Dehydrogenasen Ap9076 und Ap9346**

Die Proteine Ap9076 und Ap9346, welche mit Hilfe von Blastp-Analysen identifiziert und zur Produktion und Charakterisierung in *G. oxydans* ausgewählt wurden, stammten aus dem Essigsäurebakterium *Acetobacter pasteurianus* und stellten zwei weitere membranständige Dehydrogenasen dar. Beide Proteine können in die Klasse I der PQQ-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase eingeordnet werden, der die meisten PQQ-abhängigen membranständigen Dehydrogenasen angehören (Anthony, 2001). Basierend auf Analysen mit den Programmen TMHMM und Phobius, weisen beide Enzyme fünf N-terminal gelegene Transmembranhelices auf, über welche die Proteine in der cytoplasmatischen Membran verankert sind. Das aktive Zentrum liegt dabei im periplasmatisch orientierten Teil des Proteins. Bioinformatische Analysen zeigten, dass beide Enzyme eine für membranständige Chinoproteine der Klasse I typische  $\beta$ -Propeller-Struktur, bestehend aus acht  $\beta$ -Faltblättern, aufweisen. Das Protein Ap9076 ist in der Datenbank Interpro als PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase annotiert und bei dem Enzym Ap9346 handelt es sich laut Datenbankanalyse

um eine Dehydrogenase der Glukose-/Quinat-/Shikimat-Familie. Glukose-Dehydrogenasen oxidieren Glukose zu  $\delta$ -Glukonolakton, welches anschließend im Periplasma chemisch, oder enzymatisch durch eine Glucono- $\delta$ -Lactonase zu Glukonat hydrolysiert wird und können in den meisten Fällen auch noch andere Substrate, wie Zucker und Zuckerderivate umsetzen (Buchert und Viikari, 1988; Shinagawa *et al.*, 2009; Matsushita *et al.*, 1989; Olsthoorn und Duine, 1996). Quinat-/Shikimat-Dehydrogenasen oxidieren Quinat oder Shikimat zu 3-Dehydroquinat oder 3-Dehydroshikimat. 2013 wurde das Genom des Stammes *A. pasteurianus* 386B erstmals komplett sequenziert (Illegheims *et al.*, 2013). Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Proteine Ap9076 und Ap9346 mit den von Illegheims *et al.* (2013) annotierten PQQ-abhängigen, membranständigen Dehydrogenasen zeigten, dass das Protein Ap9076 innerhalb der Publikation als Glukose-Dehydrogenase (APA386B\_2133) und das Enzym Ap9346 als PQQ-abhängige Dehydrogenase mit unbekannter Funktion (APA386B\_1016) annotiert sind. Eine Aufreinigung der Proteine Ap9076 und Ap9346 aus *G. oxydans* BP.9 blieb zwar erfolglos, jedoch zeigten Aktivitätstests mit Membranen deutliche Unterschiede im Substratumsatz zwischen der BP.9-Mutante und den BP.9-Derivaten, die die Gene für die Dehydrogenasen aus *A. pasteurianus* exprimierten (Vgl. Kap. 3.3.5).

Aktivitätstests mit Membranen der Mutante *G. oxydans* BP.9 *ap9076*, die das Gen *ap9076* besaß, zeigten im Vergleich zur BP.9-Mutante deutliche Unterschiede bei der Oxidation von Zuckern. Diese Beobachtung wurde durch einen zweiten Versuchsansatz bestätigt, bei dem das Gen *ap9076* in die Mutante *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* eingebracht wurde und anschließend die Membranaktivitäten der generierten Mutante *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* *ap9076* und der  $\Delta$ *mgdh*-Mutante verglichen wurden (Vgl. Kap. 3.3.6). *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* weist eine Deletion des für die membranständige Glukose-Dehydrogenase kodierenden Gens *gox0265* (*mgdh*) auf und ist somit nicht mehr in der Lage Glukose und eine Vielzahl weiterer Zucker periplasmatisch zu oxidieren. Die höchste Aktivität zeigten die Membranen der Mutante *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* *ap9076* mit Glukose, wobei die spezifische Aktivität 16,5 U/mg Membranprotein (100 %, relative Aktivität) betrug. Des Weiteren konnten, mit spezifischen Aktivitäten von >7 U/mg, eine Vielzahl an Aldosen von den Membranen der Mutante *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh* *ap9076* umgesetzt werden, darunter 2-Desoxy-Glukose (69 %), D-Allose (58 %) und D-Fucose (44 %). Zudem konnte eine geringe Aktivität mit dem Zuckeralkohol Arabitol sowie mit Glycerol detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Annotation des Enzyms als Glukose-Dehydrogenase. Einige Glukose-Dehydrogenasen sind bereits in der Literatur aus den Organismen *Arthrobacter globiformis*, *A. calcoaceticus*, *E. coli*, *Gluconobacter*

*suboxydans*, *G. oxydans* und *Pseudomonas fluorescens* beschrieben (Ameyama *et al.*, 1986; Matsushita *et al.*, 1982; Meyer *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2015). Verglichen mit diesen bereits charakterisierten membranständigen Glukose-Dehydrogenasen, zeigte das Enzym Ap9076 aus *A. pasteurianus* eine auffallend hohe Aktivität mit Glukose. Ameyama *et al.*, 1981b bestimmten für die Glukose-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* eine spezifische Aktivität von 1,5 U/mg Membranprotein und auch bei Enzymen aus *A. calcoaceticus* sowie *Pseudomonas*-Spezies wurden Membranaktivitäten von weniger als 4 U/mg mit Glukose als Substrat gemessen (Umezawa *et al.*, 2015; Matsushita *et al.*, 1989; Ameyama *et al.*, 1981b). Meyer *et al.*, (2013) gelang es durch die homologe Überexpression der membranständigen Glukose-Dehydrogenase in *G. oxydans* Membranaktivitäten von ca. 13,5 U/mg zu erzielen. Dennoch zeigte die Glukose-Dehydrogenase Ap9076 aus *A. pasteurianus* eine weitaus höhere Aktivität in der Membran bei der Umsetzung von Glukose, als alle zuvor beschriebenen membranständigen Glukose-Dehydrogenasen. Um einen genauen Vergleich der Enzyme zu ermöglichen, wäre eine Aufreinigung Glukose-Dehydrogenase AP9076 notwendig. Der in dieser Arbeit an Membranen bestimmte  $K_M$ -Wert für Glukose betrug  $4 \pm 1$  mM. Betrachtet man die  $K_M$ -Werte aufgereinigter, membranständiger Glukose-Dehydrogenasen, lagen diese bei dem Enzym aus *A. globiformis* und *E. coli* bei 0,21 mM und 0,9 mM (Matsushita *et al.*, 1980; Xue *et al.*, 2015; Ameyama *et al.*, 1986). Für die aufgereinigte Dehydrogenase aus *G. oxydans* wurde ein  $K_M$ -Wert von 5,9 mM bestimmt und das gereinigte Protein aus *P. fluorescens* weist einen  $K_M$ -Wert für Glukose von 6,3 mM auf, mit DCPIP/PMS als Elektronenakzeptor bei einem pH-Wert von 8,75 (Meyer *et al.*, 2013; Matsushita *et al.*, 1980). Da der  $K_M$ -Wert des Enzyms Ap9076 für Glukose an Membranen bestimmt wurde und nicht, wie in den Publikation zu den charakterisierten Glukose-Dehydrogenasen aus *A. globiformis*, *E. coli*, *G. oxydans* und *P. fluorescens* am aufgereinigten Protein, ist hier kein direkter Vergleich der  $K_M$ -Werte möglich. Lediglich für die Glukose-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* wurde der  $K_M$ -Wert für Glukose sowohl am aufgereinigten Enzym, als auch an den Membranen bestimmt. Betrachtet man die von Matsushita *et al.* (1980) ermittelten  $K_M$ -Werte des Enzyms aus *P. fluorescens*, liegt der  $K_M$ -Wert der Membranfraktion mit einem Wert von 7,7 mM lediglich leicht über dem  $K_M$ -Wert des aufgereinigten Proteins von 6,3 mM. Somit zeigte das Enzym Ap9076, mit einem  $K_M$ -Wert von  $4 \pm 1$ , eine höhere Affinität zu Glukose als die Dehydrogenase aus *P. fluorescens*, deren an der Membranfraktion bestimmten  $K_M$ -Wert bei 7,7 mM lag.

Das ermittelte Substratspektrum der Glukose-Dehydrogenase Ap9076 ähnelt dem Substratspektrum des von Meyer *et al.* (2013) beschriebenen Enzyms aus *G. oxydans*,

unterscheidet sich aber bezüglich der Spezifität für bestimmte Zucker von den Substratspektren anderer charakterisierter Glukose-Dehydrogenasen. Ebenso wie Ap9076 zeigte die Glukose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* neben D-Glukose (100 %, relative Aktivität) die höchsten Aktivitäten mit 2-Desoxy-Glukose (72 %), D-Allose (43 %) und D-Fucose (33 %). Das Enzym aus *E. coli* hingegen zeigt eine etwas andere Spezifizierung als die Glukose-Dehydrogenasen aus *G. oxydans* und *A. pasteurianus* und wies die höchsten Aktivitäten mit Glukose (100 %), Fucose (90 %), D-Xylose (54 %) und Galaktose (41 %) auf (Ameyama *et al.*, 1986). Die von Ameyama *et al.* (1980) charakterisierte Glukose-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* konnte zwar wie Ap9076 D-Glukose, D-Xylose, D-Galaktose, D-Mannose, sowie weitere Aldosen umsetzen, zeigte jedoch lediglich mit Glukose eine hohe Aktivität. Die Aktivität des Enzyms aus *G. suboxydans* mit allen anderen Aldosen lag unter 10 % der Aktivität, die das Protein mit Glukose besaß. Die erlangten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei der Glukose-Dehydrogenase Ap9076 um ein Enzym mit einem breiten Substratspektrum für Aldosen handelt, das eine Spezifizierung für Glukose, Allose, 2-Desoxy-Glukose und Fucose aufweist. Die Membranaktivitäten für Glukose sind mit 16,5 U/mg signifikant höher als bei bereits charakterisierten Enzymen, was vermuten lässt, dass auch die spezifische Aktivität des aufgereinigten Enzyms um ein Vielfaches höher ist, als die spezifische Aktivität anderer charakterisierter Glukose-Dehydrogenasen (Matsushita *et al.*, 1980; Umezawa *et al.*, 2015; Ameyama *et al.*, 1980; Meyer *et al.*, 2013). Aufgrund der sehr hohen Aktivität mit Glukose, könnte die Glukose-Dehydrogenase Ap9076 Einsatz in der Weiterentwicklung von Biosensoren zur Glukosedetektion finden.

Biosensoren für Glukose sind seit etwa 1970 industriell etabliert und werden im klinischen Bereich für die Bestimmung von Glukosekonzentrationen im Blut von Diabetespatienten und im industriellen Bereich zur Überwachung von Synthese- und Fermentationsprozessen, sowie zur Kontrolle von Nahrungsmitteln in der Lebensmittelindustrie eingesetzt (Zafar *et al.*, 2012; Wang, 2008). Des Weiteren finden Glukose-Dehydrogenasen Anwendung in Biobrennstoffzellen, wo sie die, durch die Oxidation von Glukose gewonnenen, Elektronen auf Anoden übertragen, sodass elektrische Energie generiert wird (Kakehi *et al.*, 2007). Biobrennstoffzellen dienen beispielsweise als Stromquelle für Mikropumpen und werden häufig in der Medizintechnik z.B. in Herzschrittmachern eingesetzt (Zafar *et al.*, 2012). Im Bereich der Diagnostik, wurde in den letzten 40 Jahren eine Vielzahl an Systemen zur Glukosebestimmung im menschlichen Blut entwickelt (Yoo und Lee, 2010). Die meisten dieser Quantifizierungsmethoden basieren auf der Oxidation von Glukose durch Glukoseoxidasen. In den letzten Jahren sind jedoch die PQQ-abhängigen Dehydrogenasen als

Alternative zur Oxidase in den Fokus der Entwicklung und Weiterentwicklung von Blutzuckerbestimmungsmethoden gerückt (Yoo und Lee, 2010; D'Costa *et al.*, 1986; Smolander *et al.*, 1992). PQQ-abhängige Enzyme weisen im Vergleich zu FAD-abhängigen und NAD(P)-abhängigen Oxidoreduktasen erhebliche Vorteile auf. Im Gegensatz zu FAD-abhängigen und NAD(P)-abhängigen Proteinen, ist bei Chinoproteinen die prosthetische Gruppe PQQ fest im Protein gebunden, und dissoziiert nicht bei suboptimalen Bedingungen vom Protein. Des Weiteren weisen PQQ-abhängige Dehydrogenasen eine höhere Sauerstofftoleranz auf als viele FAD-abhängige Proteine, sowie eine deutlich höhere Aktivität und Spezifität bei der Oxidation von Glukose. Chinoproteine benötigen außerdem keine Coenzyme, um in ihrem aktiven Zustand gehalten zu werden. NAD(P)-abhängige Enzyme hingegen benötigen einen Regenerationssystem, beispielsweise eine NAD(P)H-Dehydrogenase, die das bei der Oxidation der Glukose entstehende NAD(P)H wieder zu NAD(P)<sup>+</sup> oxidiert (Smolander *et al.*, 1993; Wang, 2008). Da zum Zeitpunkt der Entwicklung erster Glukose-Quantifizierungsmethoden zum größten Teil lösliche Glukoseoxidasen und -Dehydrogenasen charakterisiert waren, basieren die meisten entwickelten Systeme auf löslichen Proteinen (Ferri *et al.*, 2011; Yoo und Lee, 2010). Für einige Biosensoren müssen diese löslichen Proteine zunächst immobilisiert werden, um die nötige Beständigkeit und Messgenauigkeit zu gewährleisten. Der Einsatz von membranständigen Glukose-Dehydrogenasen könnte diese Systeme vereinfachen, da membranständige Proteine aufgrund ihrer hydrophoben Transmembrandomänen leichter in künstliche Membranen zu integrieren sind, als lösliche Proteine mit hydrophilem Charakter. Des Weiteren könnte bei membranständigen Enzymen eine direkte Übertragung der Elektronen über in die Membran integrierte Mediatoren, wie Cytochrome oder Quinone, auf die Elektrode erfolgen. Da die in dieser Arbeit charakterisierte Glukose-Dehydrogenase AP9076 eine sehr hohe Aktivität mit Glukose besaß, könnte dieses Enzym Teil der Entwicklung einer solchen neuen Bestimmungsmethodik sein. Ein weiteres Problem, an dem bei der Weiterentwicklung von Glukosebestimmungsverfahren gearbeitet wird, ist das Ersetzen von löslichen Mediatoren zur Übertragung der Elektronen auf die Elektrode durch immobilisierte Komponenten (Wang, 2008; Ferri *et al.*, 2011). Es wäre somit denkbar, ein System zu entwickeln, bei dem PQQ-abhängige, membranständige Dehydrogenasen zusammen mit Chinonen in einer künstlichen Membran auf der Elektrode verankert werden und so eine direkte Übertragung der Elektronen vom Enzym über die Chinone auf die Elektrode stattfindet.

Der zweite Stamm, dessen Membranen deutliche Unterschiede in der Substratumsetzung verglichen zur BP.9-Mutante zeigten, war die Mutante *G. oxydans* BP.9 *ap9346*, die das als

Glukose-/Quinat-/Shikimat-Dehydrogenase annotierte Enzym Ap9346 aus *A. pasteurianus* produzierte. Die Membranen der Mutante *G. oxydans* BP.9 ap9346 wiesen eine deutliche Aktivität mit Glukose sowie primären Alkoholen auf. Des Weiteren konnten die Membranen mit geringerer Aktivität weitere Zucker, sekundäre und tertiäre Alkohole, Aldehyde, Diole und Zuckeralkohole umsetzen. Die höchsten Aktivitäten wurden dabei mit Glukose (8,9 U/mg Membranprotein) und mit Ethanol (4,3 U/mg Membranprotein) detektiert. Des Weiteren konnte das Protein mit Aktivitäten von >1 U/mg Keto-D-Glukose, Glycerol, 2-Propanol, tertiäre Alkohole (3-Hexanol und 3-Pentanol), sowie Phenylglyoxal und 1,3-Propandiol oxidieren. Ap9346 scheint somit Substrate fast aller Substratklassen umsetzen zu können und unterscheidet sich dadurch deutlich von anderen charakterisierten Glukose- und Alkohol-Dehydrogenasen. Eine Dehydrogenase mit einem derartig breiten Substratspektrum ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Unter den charakterisierten, membranständigen Glukose-Dehydrogenasen befindet sich kein Enzym, das neben Zuckern und Zuckeralkoholen auch Alkohole mit einer vergleichbaren Aktivität umsetzen kann. Lediglich die lösliche Aldose-Dehydrogenase aus *Thermus thermophilus* kann, neben einer Vielzahl von Aldosen, Alkohole wie Methanol und Ethanol, sowie Zuckeralkohole wie Xylitol und Mannitol oxidieren (Kim *et al.*, 2016). Andere beschriebene Alkohol-Dehydrogenasen, wie das Protein aus *Acetobacter polyoxygenes* sp. nov, verwenden als Substrate Alkohole und Aldehyde, können jedoch keine Glukose umsetzen (Tayama *et al.*, 1989). Shimao *et al.* (1986) charakterisierten eine Polyvinyl-Alkohol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. VM15C, die primäre, sowie sekundäre Alkohole und Diole oxidiert, jedoch Zucker nicht umsetzen kann. Die Dehydrogenase Ap9346 scheint Eigenschaften all dieser Proteine zu vereinen. Bisher galten die Polyol-Dehydrogenasen von Essigsäurebakterien als die membranständigen, PQQ-abhängigen Enzyme mit dem größten Substratspektrum. Versuche mit einer Deletionsmutante bei der die Gene für die Glycerol-Dehydrogenase in *G. suboxydans* deletiert wurden zeigten, dass das Enzym unter anderem in die Oxidation von Glycerol, Sorbitol, Mannitol, Glukonat und Ribitol involviert ist (Matsushita *et al.*, 2003). Die Glycerol-Dehydrogenase aus *Gluconobacter industrius* weist ein ähnliches Substratspektrum wie Ap9346 auf, oxidiert aber im Gegensatz zur Glukose-Dehydrogenase aus *A. pasteurianus* keine Glukose (Ameyama *et al.*, 1985b). In Bezug auf das Substratspektrum scheint eine Arabitol-Dehydrogenase aus *G. suboxydans* die größten Ähnlichkeiten mit der Dehydrogenase Ap9346 aufzuweisen. Das von Adachi *et al.* (2001) charakterisierte Protein ist in der Lage, Zuckeralkohole wie Mannitol und Sorbitol, Alkohole wie 2-Propanol und 3-Pentanol, und auch 2,3-Butandiol umzusetzen. Ethanol wird von der Arabitol-Dehydrogenase jedoch nicht oxidiert. Somit scheint sich die

Dehydrogenase Ap9346 aus *A. pasteurianus* mit ihrem breiten Substratspektrum von allen bereits charakterisierten membranständigen PQQ-Dehydrogenasen abzugrenzen. Es könnte sich bei dem Enzym um eine Art „Backup“-Protein handeln, das, sollte ein für den oxidativen Stoffwechsel essentielles Protein maximal ausgelastet sein, dessen Funktion ergänzend übernehmen kann. Die Multifunktionalität des Enzyms erklärt außerdem, warum keine präzisere funktionelle Einordnung des Proteins bei der Sequenzierung des Genoms durch Illegheims *et al.* (2013), basierend auf Sequenzvergleichen und die Identifizierung spezifischer Substratbinderegionen, erfolgen konnte. Eine nähere Beschreibung des aufgereinigten Enzyms Ap9346 ist somit von enormem Interesse, um weitere Eigenschaften dieser außergewöhnlichen Dehydrogenase zu bestimmen.

#### **4.4 Produktion des potentiellen Süßstoffes 5-Keto-D-Fruktose**

Bei Adipositas, Diabetes, Parodontose und Karies handelt es sich um Erkrankungen, deren Prävalenz besonders in der westlichen Welt immer weiter zunimmt und deren Erforschung daher verstärkt in den gesellschaftlichen Fokus rückt. In den letzten Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, dass diese Erkrankungen mit der erhöhten Aufnahme von Kohlenhydraten in Lebensmitteln, insbesondere in Form von künstlich hinzugefügten Zuckern, in direkter Verbindung stehen (Vartanian *et al.*, 2007; Montonen *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 2007). Vor allem in den USA und Europa erfolgt ein massiver Einsatz von Zuckerzusätzen wie Fruktose und Saccharose in Nahrungsmitteln, wodurch einerseits eine Geschmacksverbesserung des Produkts erreicht und andererseits die Verzehrmenge sowie das Suchtpotential des Konsumenten gesteigert wird (Blum *et al.*, 2014; Fortuna, 2012; Wang *et al.*, 2009). So konnte 2010 gezeigt werden, dass in den USA 30 % der täglich aufgenommen Kohlenhydrate aus Zuckerzusätzen bestehen, was die durch die World Health Organisation (WHO) empfohlene Konsummenge um ein dreifaches übersteigt (Welsh *et al.*, 2010). Zusätzlich konnten Stanhope *et al.* in verschiedenen Studien belegen, dass eine vermehrte Aufnahme von Zuckern, vor allem Fruktose, zu einem Anstieg des LDL-Cholesterin-Spiegels (Lipoprotein niedriger Dichte) und einer Abnahme des HDL-Cholesterins (Lipoprotein hoher Dichte) führt, sowie eine Erhöhung des Triglycerinspiegels im Blut des Konsumenten verursacht; Faktoren, durch die das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung deutlich gesteigert wird (Stanhope, 2016; Stanhope und Havel, 2009; Stanhope *et al.*, 2009). Basierend auf der Tendenz der erhöhten Zuckeraufnahme des Menschen und den damit verbundenen negativen Auswirkungen auf den menschlichen Metabolismus, ist die Nachfrage an alternativen Süßungsmitteln enorm gestiegen. Besonders natürlich vorkommende Süßstoffe mit niedrigen



Kalorienwerten sind in den Fokus der Nahrungsmittelindustrie gerückt. Zu den bereits etablierten synthetischen Süßungsmitteln zählen unter anderem Saccharin, Acesulfam-K, Sucralose, Aspartam und Neotam (Mattes und Popkin, 2009). Nachteile dieser synthetisch hergestellten Süßstoffe können zum Beispiel kostspielige Syntheseverfahren, künstliche Geschmäcker oder unerwünschte Nebenwirkungen beim Konsumenten sein. So kann Sucralose bei Fruktose-intoleranten Menschen zu Flatulenz infolge einer gesteigerten Gasentwicklung im Darm führen. Diverse andere Studien deuten außerdem darauf hin, dass Aspartam möglicherweise karzinogene Eigenschaften aufweist (Weihrauch und Diehl, 2004; Soffritti *et al.*, 2006; Olney *et al.*, 1996; Belpoggi *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigten Suez *et al.* (2014), dass der artifizielle Süßstoff Saccharin das Mikrobiom der Darmflora bei Mäusen beeinflusst und darauf basierend zu einer Glukoseintoleranz führen kann. Zwei weitere, nicht artifizielle und in der Lebensmittelindustrie verwendete Zuckerersatzstoffe sind die Ketohexose Tagatose und der Zuckeralkohol Xylitol. Beide Verbindungen weisen zwar einen hohen Süßungsgrad auf, können jedoch vom menschlichen Metabolismus teilweise verstoffwechselt werden, sodass sie einen eigenen kalorischen Wert besitzen (Grembecka, 2015; Vastenavoond *et al.*, 2012). Im Unterschied zu artifiziellen Süßungsmitteln können Tagatose und Xylitol bakteriell synthetisiert werden. Die Verwendung von Essigsäurebakterien aus der Familie der *Acetobacteraceae* zur Produktion von Tagatose und Xylitol ist bereits etabliert. So besitzt *G. oxydans* DSM 2343 beispielsweise die Fähigkeit Galaktitol mit Hilfe einer Sorbitol-Dehydrogenase zu Tagatose umzusetzen (Rollini und Manzoni, 2005). Darüber hinaus zeigten Sugiyama *et al.* (2003), dass *G. oxydans* ATCC 621 über eine NADPH-abhängige Xylitol-Dehydrogenase verfügt, die D-Xylulose zu D-Xylitol reduziert. Dennoch ist die Nachfrage an neuen nicht artifiziellen Süßungsmitteln mit natürlichem Geschmack und niedrigem Kaloriengehalt groß. Die Entwicklung neuer biotechnologischen Anwendungen zur Herstellung solcher Zuckerersatzstoffe birgt somit ein großes industrielles Interesse. Da Essigsäurebakterien bereits in vielen industriellen Fermentationsprozessen etabliert sind, könnte die Verwendung eines *Gluconobacter*-Stammes in einem derartigen System Vorteile bieten, insbesondere aufgrund der metabolischen Besonderheiten, die das Essigsäurebakterium aufweist. Daher orientiert sich die, in dieser Arbeit beschriebene, Entwicklung von Biotransformationsmethoden zur Herstellung von 5-Keto-D-Fruktose mit Hilfe von *G. oxydans*, an der gesellschaftlichen Notwendigkeit, Alternativen für den Zuckereinsatz in der Lebensmittelindustrie zu finden.

5-Keto-D-Fruktose wurde erstmals zu Beginn der 60er Jahren als Nebenprodukt bei der Produktion von Kojic-Säure aus Sorbose mittels *Acetobacter*-Stämmen, sowie beim

Wachstum von *Gluconobacter cerinus* auf Fruktose nachgewiesen (Weidenhagen und Bernsee, 1960; Terada *et al.*, 1961). Die Bildung von 5-Keto-D-Fruktose konnte einem membranständigen Enzymkomplex zugeschrieben werden, der als Fruktose-Dehydrogenase identifiziert wurde (Englard und Avigad, 1965). In den 70er Jahren erfolgte dann die Identifizierung weiterer Organismen, bei denen 5-Keto-D-Fruktose als Nebenprodukt in geringen Konzentrationen bei der Oxidation von Sorbose auftrat, wie *Pseudomonas convexa* oder *G. suboxydans* (Longley und Perlman, 1972; Sato *et al.*, 1969). Ano *et al.* (2017) konnten darüber hinaus nachweisen, dass auch der Stamm *G. thailandicus* (früher *G. suboxydans*) zur Umsetzung von geringen Mengen Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose befähigt ist. Bis heute sind jedoch nur zwei *Gluconobacter*-Stämme bekannt, die Fruktose effizient zu 5-Keto-D-Fruktose oxidieren, *G. cerinus* und *G. japonicus* (Ameyama *et al.*, 1981a; Englard und Avigad, 1965; Yamada *et al.*, 1966). Die Fruktose-Dehydrogenasen aus *G. cerinus* und *G. japonicus* zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber Fruktose, sodass die Enzymkomplexe für die Entwicklung von Detektionsmethoden für Fruktose genutzt wurden (Ameyama *et al.*, 1981b; Yamada *et al.*, 1966). Seit der Identifizierung und Charakterisierung der ersten Fruktose-Dehydrogenasen, konzentrierte sich die Forschung in diesem Gebiet ausschließlich auf die Weiterentwicklung und Verbesserung von Biosensoren, mit deren Hilfe Fruktose in Lebensmitteln und industriellen Fermentationsprozessen detektiert werden kann. Hierbei handelt es sich vornehmlich um amperometrische Detektionsmethoden, bei denen die Fruktose-Dehydrogenase auf einer Metallelektrode immobilisiert wird. In Anwesenheit von Fruktose, wird diese durch die Fruktose-Dehydrogenase oxidiert und die dabei freigesetzten Elektronen über einen Mediator, wie beispielsweise Ferricyanid, auf die Elektrode übertragen, wodurch ein elektrochemischer Stromfluss erzeugt wird, der detektierbar ist (Ikeda *et al.*, 2014; Matsumoto *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2009; Trivedi *et al.*, 2009). Dass das Produkt des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes, die 5-Keto-D-Fruktose, jedoch ein eigenes großes industrielles Potential aufweist, blieb bislang weitgehend unbeachtet.

5-Keto-D-Fruktose besitzt als Derivat der Fruktose eine vergleichbar starke Süßkraft wie die Ketose (persönliche Mitteilung, M. Sc. Elena Herweg, RWTH Aachen). Zudem kann 5-Keto-D-Fruktose vom menschlichen Organismus nicht, oder nur teilweise metabolisiert werden und weist somit einen sehr geringen Kaloriengehalt auf (Wyrobnik *et al.*, 2012). Obwohl das Fruktosederivat von Hexokinasen der Leber als Substrat genutzt und zu 5-Keto-Fruktose-1-Phosphat umgesetzt werden kann, erfolgt nach dem Phosphorylierungsschritt keine Spaltung des 5-Keto-Fruktose-1-Phosphats durch Aldolasen (Avigad und Englard, 1968). Englard *et al.*

(1972) zeigten, dass 5-Keto-Fruktose-1-Phosphat zwar durch Aldolasen aus der Leber gebunden wird, jedoch, aufgrund der zweiten Ketogruppe des Moleküls am C<sub>5</sub>-Atom, keine weitere Umsetzung erfolgt. Des Weiteren konnte eine Inhibierung der Aldolasen durch 5-Keto-Fruktose-1-Phosphat beobachtet werden, wenn ein Reduktionsmittel wie Natriumborhydrid in den Reaktionsansatz gegeben wird (Englard *et al.*, 1972). Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte dieser inhibierende Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zur Verstoffwechslung von 5-Keto-D-Fruktose im menschlichen Metabolismus sind demnach notwendig.

Der neue potentielle Süßstoff 5-Keto-D-Fruktose konnte bereits in verschiedenen Nahrungsmitteln nachgewiesen werden; darunter Weißwein, Honig und Holunderblütensirup (Burroughs und Sparks, 1973; diese Arbeit). Erste Tests bezüglich des Geschmacks von 5-Keto-D-Fruktose zeigten zudem, dass keine sensorischen Unterschiede zu Fruktose feststellbar sind (persönliche Mitteilung, M. Sc. Elena Herweg, RWTH Aachen), sodass sich dieses in Lebensmitteln natürlich vorkommende Zuckerderivat als ein geeigneter Kandidat für die Etablierung eines neuen Süßstoffes erwies. Somit stand die Entwicklung eines geeigneten Systems zur effizienten und kostengünstigen Produktion des potentiellen Süßungsmittel 5-Keto-D-Fruktose im Mittelpunkt des letzten Teils dieser Arbeit. Die Basis zur Entwicklung eines solchen Synthesystems bildete dabei der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus*.

#### **4.4.1 Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus***

Innerhalb der Gattung *Gluconobacter* gibt es zwei bereits beschriebene Fruktose-Dehydrogenasen. Einer der Enzymkomplexe stammt aus *G. cerinus* und wurde 1966 von Yamada *et al.* aufgereinigt und charakterisiert. Der zweite Enzymkomplex wurde 1981 erstmals von Ameyama *et al.* aus *G. japonicus* (damals *G. industrius*) isoliert und 2013 erfolgte eine genauere Charakterisierung der Fruktose-Dehydrogenase durch Kawai *et al.*. Da der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* die höchste Aktivität verglichen mit anderen beschriebenen Fruktose-Dehydrogenasen aufwies und in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produzierbar war (Vgl. Kap. 3.4.2), sollte dieser Enzymkomplex zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Fruktose eingesetzt werden. Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit (FdhL und FdhS), sowie einem Cytochrom *c* (FdhC) (Ameyama *et al.*, 1981) und gleicht damit dem strukturellen Aufbau von Alkohol- und Sorbitol-Dehydrogenasen, die aus verschiedenen *Gluconobacter*- und *Acetobacter*-Spezies beschrieben sind (Ameyama und Adachi, 1982; Kondo und

Horinouchi, 1997; Choi *et al.*, 1995; Shinagawa *et al.*, 1982). Bioinformatische Analysen zeigten, dass das Cytochrom FdhC über eine C-terminale Helix in der cytoplasmatischen Membran verankert ist und drei Häm-Bindemotive besitzt. FdhL und FdhS sind im Periplasma lokalisiert und lediglich durch Interaktion mit der FdhC-Einheit sowie mit der cytoplasmatischen Membran verbunden. Die Funktion der kleinen Untereinheit FdhS ist noch ungeklärt (Ameyama *et al.*, 1981). FdhS besitzt ein Tat-Signalpeptid und wird vermutlich zusammen mit der FdhL-Einheit, die keine eigene Signalsequenz aufweist, über die cytoplasmatische Membran transportiert (Kawai *et al.*, 2013). Inwiefern FdhS Einfluss auf die Aktivität des Proteinkomplexes hat, ist bisher noch unerforscht. Das aktive Zentrum des Enzyms liegt in der großen Untereinheit FdhL, die ein N-terminal gebundenes FAD als Cofaktor besitzt. Ebenso verhält es sich mit der Substratbindestelle für Fruktose, die laut Interpro C-terminal in der FdhL-Untereinheit lokalisiert ist und aus  $\beta$ -Faltblättern besteht, die von  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Bei der Oxidation von Fruktose freigesetzte Elektronen werden von der FdhL-Untereinheit auf das membranständige Cytochrom *c* übertragen und fließen von da über membranintegrierte Ubichinone in die Atmungskette ein (Murata *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 2013). BlastP-Analysen zeigen, dass viele *Gluconobacter*-Spezies zu FdhL homologe Proteine mit einer Identität von >95 % besitzen, darunter die Stämme *G. frateurii*, *G. albidus*, *G. cerinus* und *G. suboxydans*. Diese, zu FdhL homologen, Proteine sind bisher nicht charakterisiert worden und in der Datenbank Interpro als Oxidoreduktasen der Glukose-Methanol-Cholin-Familie annotiert, die Flavoenzyme, wie beispielsweise Glukose-Dehydrogenasen, Glukose-Oxidasen und Cholin-Dehydrogenasen, umfasst.

Die Gene des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes aus *G. japonicus* sind in einem Operon organisiert und wurden in Rahmen dieser Arbeit zusammen amplifiziert und in den Expressionsvektor pBBR1p264-St kloniert. Die Produktion der Fruktose-Dehydrogenase wurde in dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* durchgeführt. Über den C-terminal mit der Untereinheit FdhL fusionierten Strep-Tag II konnten 0,25 mg Protein pro 500 ml Kultur, nach Solubilisierung des Komplexes aus den Membranen, isoliert werden. Der Nachweis der FdhL-Einheit mittels Western Blot zeigte eine Proteinbande von 61 kDa, was mit dem vorhergesagten Molekulargewicht des Proteins von 61,3 kDa übereinstimmte. Die Silberfärbung des solubilisierten und aus der Membranfraktion aufgereinigten Proteinkomplexes zeigte eine Doppelbande von 60 kDa und 75 kDa sowie eine weitere Bande mit einer Größe von 17 kDa. Die 61 kDa-Proteinbande entspricht der erwarteten Größe der FdhL-Einheit von 61,3 kDa und die 17 kDa-Bande konnte der kleinen Untereinheit FdhS zugeordnet werden, die ein berechnetes Molekulargewicht von 16,7 kDa aufweist. Bei der

Proteinbande mit der Größe von 75 kDa handelt es sich wahrscheinlich um eine Kontamination durch ein co-eluiertes Protein, das entweder eine hohe Affinität zum Strep-Tactin der Säulenmatrix aufwies, oder während der chromatographischen Aufreinigung an den FdhL/FdhS-Komplex gebunden vorlag. Eine Bande auf der Höhe von 51,3 kDa, was dem Molekulargewicht von FdhC entspricht, konnte nicht detektiert werden. Auch die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums zeigte keine der, für Cytochrom *c*-charakteristischen, Peaks im Bereich von 415-423 nm ( $\gamma$ -Peak), 521-527 nm ( $\beta$ -Peak) und 550-558 nm ( $\alpha$ -Peak) (Lemberg und Barrett, 1973). Somit scheint die Interaktion zwischen FdhL und FdhS stark genug für eine Co-Isolierung der beiden Untereinheiten zu sein, die Bindung zwischen FdhS/FdhL und FdhC jedoch eher schwach ausgeprägt, da das Cytochrom *c* bei der Aufreinigung verloren ging. Da sowohl die Membranfraktion nach Zellaufschluss, als auch die lösliche Fraktion eine Aktivität mit Fruktose aufwies, scheint ein Teil der FdhL ungebunden im Periplasma vorzuliegen. Diese Beobachtung unterstützt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die Untereinheiten FdhS und FdhL eine starke Bindung zueinander aufweisen, mit der membranständigen FdhC-Einheit jedoch nur in lockerer Interaktion stehen. Die spezifische Aktivität des, aus der Membranfraktion aufgereinigten, Enzymes betrug  $127,7 \pm 7,7$  U/mg und die spezifische Aktivität der, aus der löslichen Fraktion aufgereinigten, Fruktose-Dehydrogenase lag bei  $63,9 \pm 4,3$  U/mg. Die Unterschiede in der spezifischen Aktivität der Elutionsfraktionen können auf die in der Silberfärbung erkennbaren Kontaminationen im Eluat der, aus der löslichen Fraktionen aufgereinigten, Dehydrogenase zurückgeführt werden (Vgl. Kap.3.4.1), die in die Berechnung der spezifischen Aktivität pro mg Protein einfließen. Ameyama *et al.* (1981), die den Fruktose-Dehydrogenase-Komplex erstmals aus *G. japonicus* isolierten, bestimmten eine spezifische Aktivität von 172 U/mg. Kawai *et al.* (2013) tauschten das Startcodon TTG des, für die FdhL-Untereinheit kodierenden, Gens gegen das übliche Startcodon ATG aus und erzielten eine Zunahme der spezifischen Aktivität des Enzyms in der Membranfraktion von 3,5 U/mg auf 16 U/mg. Die von Kawai *et al.* (2013) postulierte spezifische Aktivität der modifizierten FdhL lag nach Austausch des Startcodons bei 260 U/mg. Die in dieser Arbeit bestimmte Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase weicht ca. 25 % von der von Kawai *et al.* (2013) bestimmten Aktivität ab. Auch der Unterschied der von Kawai *et al.* (2013) und Ameyama *et al.* (1981) bestimmten spezifischen Aktivitäten ist relativ groß und es ist diskutabel, ob der Austausch einer Aminosäure, durch Modifikation des Startcodons, die spezifische Aktivität des Proteins so maßgeblich beeinflussen kann. Dass die Expressions- und Translationsrate des Proteins durch das veränderte Startcodon erhöht wurde und dadurch der Anteil an Fruktose-Dehydrogenase in der Membran gestiegen ist, was zu

einer erhöhten, messbaren Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase in der Membranfraktion führt, erscheint verständlich. Dass die von Kawai *et al.* (2013) postulierte spezifische Aktivität des aufgereinigten Enzyms jedoch um 44 % höher sein soll als bei Ameyama *et al.* (1981) ist nicht nachvollziehbar. Neben dem Enzymkomplex aus *G. japonicus* ist lediglich eine weitere Fruktose-Dehydrogenase aus *G. cerinus* beschrieben (Yamada *et al.*, 1966). Die spezifische Aktivität des Enzyms mit Fruktose als Substrat beträgt 126 U/mg und liegt somit im gleichen Bereich, wie die in dieser Arbeit bestimmte spezifische Aktivität des Proteins aus *G. japonicus*. Im Gegensatz zu dem Enzym aus *G. japonicus*, das ausschließlich Fruktose oxidiert, weist die Dehydrogenase aus *G. cerinus* ein breites Substratspektrum auf und ist in der Lage neben Fruktose eine Vielzahl an Aldosen, sowie Glukonat zu oxidieren. Das pH-Optimum der Fruktose-Dehydrogenase aus *G. japonicus* liegt bei pH 4 im Fall des membrangebundenen Enzyms und bei pH 6 nach Solubilisierung und der  $K_M$ -Wert für Fruktose wurde von Ameyama *et al.* auf 10 mM bestimmt (Ameyama *et al.*, 1981; Kawai *et al.*, 2013). Für die Fruktose-Dehydrogenase aus *G. cerinus* wurde ein pH-Optimum von 5 und ein  $K_M$ -Wert für Fruktose von 10  $\mu$ M bestimmt, was um ein tausendfaches unter dem  $K_M$ -Wert der Dehydrogenase aus *G. japonicus* liegt.

Da die Produktion der 5-Keto-D-Fruktose in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* erfolgen sollte, wurden zunächst Membranaktivitätstests durchgeführt, um die Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase unter physiologischen Bedingungen zu testen. Als Vergleichswert wurden die Membranaktivitäten des Wirtsorganismus *G. japonicus* bestimmt, aus dem die, für den Fruktose-Dehydrogenase-Komplex kodierenden, Gene stammten. Da nicht bekannt ist, ob der native Promotor der Fruktose-Dehydrogenase durch Fruktose induziert wird, wurden Membranpräparationen des Stammes *G. japonicus* sowohl bei Wachstum mit Mannitol als C-Quelle, als auch bei Wachstum mit Fruktose als Substrat angefertigt. Die Membranen des *G. japonicus*-Stammes der auf Mannitol kultiviert wurde, zeigten eine Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase von  $0,027 \pm 0,009$  U/mg und für die Membranen der *G. japonicus*-Kultur, die auf Fruktose angezogen wurde, konnten Membranaktivitäten von  $0,06 \pm 0,005$  U/mg detektiert werden. Es scheint somit eine leicht verstärkte Expression der *fdh*-Gene stattzufinden, wenn Fruktose als Substrat genutzt wird. Somit ist eine leichte Induktion des *fdh*-Promotors durch Fruktose wahrscheinlich, insgesamt fällt der Proteinanteil der Fruktose-Dehydrogenase am Gesamtprotein der Membranen in *G. japonicus* jedoch eher gering aus. Die Membranen des Stammes *G. oxydans* 621  $\Delta$ *hsdR fdh*, der die Fruktose-Dehydrogenase aus *G. japonicus* produziert, oxidierten Fruktose mit einer Aktivität von  $0,99 \pm 0,13$  U/mg. Somit konnte gezeigt werden, dass der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aktiv in die

cytoplasmatische Membran integriert wurde und dadurch der Stamm *G. oxydans* 621  $\Delta$ *hsdR fdh* Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose umsetzen konnte. Verglichen mit den Membranaktivitäten des Wirtsstammes *G. japonicus*, lag die Membranaktivität des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* um ein 15-faches höher, sodass sich dieser Stamm als geeignet für die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose erwies. Die Membranen des Kontrollstammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* hingegen zeigten keine signifikante Aktivität mit Fruktose als Substrat. Somit ist der Kontrollstamm nicht in der Lage Fruktose mit Hilfe membranständiger Dehydrogenasen zu oxidieren, sondern kann Fruktose nur cytoplasmatisch über den Pentosephosphatweg oder den Entner-Doudoroff-Weg metabolisieren.

#### **4.4.2 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose mit dem Stamm *G. oxydans* 621H $\Delta$ *hsdR***

Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* konnte im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produziert und die Aktivität des Enzymkomplexes in den Membranen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* nachgewiesen werden. Um die Effizienz des Stammes in der Umsetzung von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose zu analysieren, wurden Experimente mit wachsenden Zellen durchgeführt. Durch Wachstumsversuche mit Fruktose als Kohlenstoffquelle konnte gezeigt werden, dass der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* Fruktose höchst effizient, mit einer Ausbeute von  $92.5 \pm 2 \%$ , zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert. Vergleicht man die Verdopplungszeit von 3,6 h des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* mit der Verdopplungszeit von 6,4 h des Kontrollstammes bei Wachstum mit Fruktose als C-Quelle (Vgl. Kap. 3.5.1), ist deutlich zu erkennen, dass der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Kontrollstamm aufweist. *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* besitzt keine membrangebundenen Dehydrogenasen zur Oxidation von Fruktose, sodass die Metabolisierung der Fruktose lediglich cytoplasmatisch erfolgen kann, wo nach der Phosphorylierung der Fruktose zunächst Fruktose-6-phosphat entsteht. Da *G. oxydans* keine Phosphofruktokinase besitzt, fließt Fruktose-6-phosphat in den Pentosephosphatweg ein und wird von Transketolasen und Transaldolasen zu Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt, welches über 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat verstoffwechselt werden kann. Hierbei wird, durch die Dehydrogenierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat, NADH und, durch die Dephosphorylierung von 1,2-Bisphosphoglycerat und PEP, ATP generiert und somit Energie konserviert (Richhardt *et al.*, 2013a, 2012; Deppenmeier und Ehrenreich, 2009). Neben der Verstoffwechslung über den Pentosephosphatweg, kann Fruktose-6-phosphat zudem von der Glukose-6-phosphat-Isomerase in Glukose-6-phosphat überführt und in den Entner-Doudoroff-Weg eingespeist werden, wo es über 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat (KDPG)

zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt und NADPH generiert wird (Krajewski *et al.*, 2010; Richhardt *et al.*, 2012). Die weitere Verstoffwechslung von Pyruvat zu Acetat kann in Bakterien generell auf drei unterschiedliche Weisen erfolgen. Zum einen kann Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung in Acetyl-CoA überführt werden. Dieses fließt anschließend entweder in den Tricarbonsäurezyklus ein oder dient der Generierung von Acetat mittels Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase. Zum anderen kann die Umsetzung des Pyruvats mittels Pyruvat:Chinon-Oxidoreduktase erfolgen, oder drittens, durch eine Pyruvat-Decarboxylase, die Pyruvat zu Acetaldehyd umsetzt, welches anschließend von einer Acetaldehyd-Dehydrogenase unter Generierung von NADPH zu Acetat oxidiert wird. *G. oxydans* verfügt zwar über einen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (Gox2289-Gox2292), der die Decarboxylierung des Pyruvats katalysiert, besitzt jedoch keine Gene, die für eine Phosphotransacetylase und eine Acetat-Kinase kodieren. Des Weiteren konnte kein Gen im Genom von *G. oxydans* identifiziert werden, das für eine Pyruvat:Chinon-Oxidoreduktase kodiert, wohingegen für eine Pyruvat-Decarboxylase (*gox1081*), sowie für eine Acetaldehyd-Dehydrogenase (*gox2018*) kodierende Gene vorhanden sind (Krajewski *et al.*, 2010). Die Umsetzung von Pyruvat mittels Pyruvat-Decarboxylasen ist bei Pflanzen weit verbreitet, tritt bei Bakterien jedoch sehr selten auf. Lediglich für *Z. mobilis*, *Sarcina ventriculi* und Essigsäurebakterien ist diese Art der Pyruvat-Metabolisierung bekannt (Bauchop und Dawes, 1959; de Ley und Schell, 1962; Dawes *et al.*, 1966; Bringer-Meyer *et al.*, 1986). Die cytoplasmatische Energiekonservierung über den Pentosephosphatweg oder den Entner-Doudoroff-Weg läuft um ein Vielfaches langsamer ab, als die Oxidation eines Substrates durch membrangebundene Dehydrogenasen, bei denen die Elektronen aus der Oxidationsreaktion direkt über die Ubichinone der cytoplasmatischen Membran in die Atmungskette einfließen. Durch die Übertragung der Elektronen auf den finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff mittels der endständigen Ubichinon-Oxidase erfolgt die Generierung eines elektrochemischen Gradienten, der durch die ATP-Synthase zur ATP-Synthese genutzt werden kann (Deppenmeier *et al.*, 2002; Prust *et al.*, 2005). Da der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* über die Fruktose-Dehydrogenase aus *G. japonicus* als zusätzliches membranständiges Enzym verfügt, kann dieser Fruktose direkt an der cytoplasmatischen Membran oxidieren und dadurch effizienter Energie konservieren sowie Biomasse produzieren, als der Kontrollstamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*, der Fruktose lediglich cytoplasmatisch verstoffwechselt. Auf diese Weise entsteht ein Wachstumsvorteil für den Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* gegenüber dem Kontrollstamm, der sich in der höheren Wachstumsrate und der geringeren Verdopplungszeit des Stammes widerspiegelt. Über einen



Zeitraum von 30 h wurde die gesamte, im Medium enthaltene Fruktose von dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* umgesetzt. 90 % der Fruktose wurde zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert und die restlichen 10 % wurden in die Zelle aufgenommen und cytoplasmatisch metabolisiert. Beim *G. oxydans*-Wildtyp konnte keine 5-Keto-D-Fruktose-Bildung beobachtet werden. Um zu bestätigen, dass es sich bei dem entstandenen Oxidationsprodukt des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh* um 5-Keto-D-Fruktose handelte, wurde der Kulturüberstand mittels  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie analysiert.

#### 4.4.3 Identifizierung des Fermentationsproduktes 5-Keto-D-Fruktose mittels $^{13}\text{C}$ NMR-Spektroskopie

Das  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum des lyophilisierten Kulturüberstandes vom Fermentationsversuch zur Umsetzung von Fruktose zu 5-Keto-Fruktose (Vgl. Kap. 3.5.2) zeigte die, von Blanchard *et al.* (1982) für 5-Keto-D-Fruktose als typisch, postulierten Peaks. 5-Keto-D-Fruktose kann in unterschiedlichen Formen vorliegen, abhängig vom Lösungsmittel in dem die Verbindung zum Zeitpunkt der Aufnahme des  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrums gelöst ist. In DMSO- $d_6$  bildet 5-Keto-D-Fruktose, ebenso wie in seiner kristallinen Form, Dimere, bestehend aus einem Furanose- und einem Pyranose-Ring aus, und liegt dementsprechend als Spiran vor. Spirane sind organische, polycyclische Verbindungen, deren Ringstrukturen lediglich über ein Atom miteinander verbunden sind (Brewer *et al.*, 1982). In  $\text{D}_2\text{O}$  hingegen liegt 5-Keto-D-Fruktose zu >95 % als  $\beta$ -Pyranose vor. Die  $\beta$ -Furanoseform bildet einen Anteil von ca. 2 % (Blanchard *et al.*, 1982). Das  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum der Fruktose, die als Substrat eingesetzt und zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt wurde, zeigte, dass diese überwiegend als  $\beta$ -Pyranose vorlag, sodass zu erwarten war, dass auch dies die Hauptform der 5-Keto-D-Fruktose ist. Avigad und England, (1965) zeigten außerdem, dass im  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum der 5-Keto-D-Fruktose keine freien Ketogruppen auftreten, die unter den vorhandenen Bedingungen in einem Bereich von >200 ppm zu erwarten gewesen wären; eine Beobachtung, die durch das in dieser Arbeit angefertigte  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum bestätigt werden konnte. Durch  $^1\text{H}$  NMR- und  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie, sowie Infrarotmessungen, konnte zudem gezeigt werden, dass die Ketogruppen der 5-Keto-D-Fruktose als Hemiacetale vorliegen und es sich bei dem  $\text{C}_5$ -Atom der 5-Keto-D-Fruktose um ein Gem-Diol handelt, also um ein C-Atom, das zwei Hydroxylgruppen gebunden hat (Blanchard *et al.*, 1982; Brewer *et al.*, 1982; Avigad und England, 1964). Da Gem-Diole selten bei Ketoheptosen auftreten und die meisten Hexokinosen freie Ketogruppen besitzen (Blanchard *et al.*, 1982), handelt es sich bei der 5-Keto-D-Fruktose um ein Molekül mit ungewöhnlicher Struktur. Um weiterhin zu bestätigen, dass die Oxidation der Fruktose am  $\text{C}_5$ -Atom stattfindet, führten England *et al.*, (1965)

Studien mit  $5\text{-}^3\text{H}$ -Fruktose durch. Da die entstandene 5-Keto-D-Fruktose das Tritium am  $\text{C}_5$ -Atom nach erfolgter Oxidation nicht mehr aufwies, konnte bewiesen werden, dass die Fruktose-Dehydrogenase das  $\text{C}_5$ -Atom der Fruktose oxidiert.

Neben der  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie gibt es eine Reihe weiterer Detektionsmethoden zum Nachweis von 5-Keto-D-Fruktose (Imada *et al.*, 1966; Avigad und England, 1965). 5-Keto-D-Fruktose kann, aufgrund des verlangsamten Laufverhaltens, mittels Dünnschichtchromatographie von Fruktose und anderen Hexosen, wie Sorbose, getrennt werden. Durch Farbstoffe wie das *o*-Aminodiphenyl-Reagenz, oder das *p*-Anisidin-HCl-Reagenz können anschließend Zuckerverbindungen identifiziert und Aldosen von Ketosen differenziert werden. Des Weiteren existiert eine Vielzahl an spektrometrischen Nachweismethoden für 5-Keto-D-Fruktose, bei denen durch Zugabe spezieller Reagenzien die Ausbildung von Farbkomplexen initiiert wird. Diese Farbkomplexe weisen dann spezifische Absorptionsmaxima auf und sind photometrisch detektierbar. Zu diesen Reagenzien gehören beispielsweise das Roe's-Resorcinol Reagenz, das mit Ketosen reagiert, das *o*-Aminodiphenyl Reagenz, welches mit Aldosen interagiert, oder das Methylphenylhydrazine-Sulfat-Reagenz, das mit 5-Ketohexonsäuren einen Farbkomplex bildet. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima, die die jeweiligen Reagenzien bei Interaktion mit den Zuckerderivaten ausbilden, kann eine Differenzierung zwischen 5-Keto-D-Fruktose und anderen Zuckern vorgenommen werden, sowie eine Quantifizierung des jeweiligen Zuckers basierend auf der Stärke der Absorptionsmaxima erfolgen (Avigad und England, 1965; Imada *et al* 1966). Ein großer Nachteil dieser Detektions- und Quantifizierungsmethoden ist, dass sie eine hohe Störungsanfälligkeit durch Nebenprodukte aufweisen, die beispielsweise während einer Fermentation anfallen können. Die von Avigad und England (1964) aufgezeigten Detektionsmethoden wurden mit zuvor kristallisierter 5-Keto-D-Fruktose durchgeführt und eignen sich somit nur bedingt für Proben, die weitere Zuckerderivate oder Medienbestandteile aufweisen. Der Nachweis und die Quantifizierung von 5-Keto-D-Fruktose mittels HPLC ist die bislang präziseste Methode und wurde in dieser Arbeit für die Quantifizierung der 5-Keto-D-Fruktose bei der Umsetzung von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose an wachsenden Zellen (Vgl. Kap. 3.5.1) verwendet. Da 5-Keto-D-Fruktose jedoch nicht kommerziell erworben werden kann, ist die Erstellung eines 5-Keto-D-Fruktose-Standards schwierig. Des Weiteren kann es zu Überlagerungen des HPLC-Signals der 5-Keto-D-Fruktose mit den Signalen anderer Ketoverbindungen, wie 2-Ketoglukonat kommen, liegen diese in hohen Konzentrationen vor. Die Etablierung einer alternativen, sensibleren und

genaueren Quantifizierungsmethode von 5-Keto-D-Fruktose war somit notwendig und ein Bestandteil dieser Arbeit.

#### **4.4.4 Der Ketofruktose-Reduktase-Assay – Eine neue Methode zur Quantifizierung von 5-Keto-D-Fruktose**

In einigen Mikroorganismen, die Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose oxidieren können, wurden Enzyme identifiziert, die die Rückreaktion dieser Redoxreaktion katalysieren. Diese sogenannten Ketofruktose-Reduktasen reduzieren in Abhängigkeit von NADPH 5-Keto-D-Fruktose zu Fruktose und sind unter anderem aus den Stämmen *Erwinia citreus*, *Acetobacter albidus* und *G. cerinus* bekannt und teilweise beschrieben (Schrimsher *et al.*, 1988; Aida und Yamada, 1964; Avigad *et al.*, 1966). Untersuchungen von Mowshowitz *et al.* (1974) zeigten, dass 5-Keto-D-Fruktose in *G. cerinus* maßgeblich am Ende der exponentiellen Phase und zu Beginn der stationären Phase gebildet wird. Die gebildete 5-Keto-D-Fruktose akkumuliert im Medium und wird, nach vollständiger Oxidation der im Medium enthaltenen Substrate, wieder in die Zelle aufgenommen und von einer Ketofruktose-Reduktase zu Fruktose reduziert. Da bei der Reduktion von 5-Keto-D-Fruktose zu Fruktose NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird, wird vermutet, dass dieser Kreislauf in *G. cerinus* der Regenerierung von NADP<sup>+</sup> dient (Mowshowitz *et al.*, 1974). Zudem ist anzunehmen, dass es sich bei der Akkumulierung von 5-Keto-D-Fruktose um eine Art Substratspeicherung handelt und die 5-Keto-D-Fruktose, nach Verbrauch aller Substratquellen, durch Reduktion zu Fruktose dem bakteriellen Metabolismus wieder zur Verfügung gestellt wird. Da die beschriebenen Ketofruktose-Reduktasen eine hohe Spezifität für 5-Keto-D-Fruktose aufweisen, wurde in dieser Arbeit, basierend auf dieser Enzymklasse, eine neue enzymatische Nachweismethode für 5-Keto-D-Fruktose entwickelt. Über Blastp-Analysen wurde eine Ketofruktose-Reduktase aus *Tatumella morbirosei* identifiziert, die Homologien zu dem charakterisierten Enzym aus *E. citreus* aufwies. Das Enzym aus *T. morbirosei* 23827 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) produziert und aufgereinigt. Die Ketofruktose-Reduktase besaß eine maximale spezifische Aktivität von  $777 \pm 8,2$  U/mg und der  $K_M$ -Wert für 5-Keto-D-Fruktose lag bei  $0,71 \pm 0,07$  mM. Die Ketofruktose-Reduktase aus *E. citreus* weist zwar, verglichen mit dem, in dieser Arbeit beschriebenen, Enzym aus *T. morbirosei* 23827, mit 2450 U/mg eine höhere spezifische Aktivität auf, der  $K_M$ -Wert des Enzyms liegt jedoch bei 12,7 mM und damit um ein 18-faches über dem  $K_M$ -Wert der Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei* 23827. Die  $K_M$ -Werte zwei weiterer beschriebener Ketofruktose-Reduktasen aus *G. cerinus* und *A. albidus* wurden auf 4,5 mM und 6,7 mM bestimmt und die spezifische Aktivität des Enzyms aus *G. cerinus* beträgt 627 U/mg (Avigad *et al.*, 1966; Aida und Yamada, 1964).

Somit weist das Enzym aus *T. morbirosei* 23827 die höchste bisher beschriebene Affinität gegenüber 5-Keto-D-Fruktose auf. Dass die Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei* 23827 nicht nur eine starke Affinität zu 5-Keto-D-Fruktose aufwies, sondern außerdem eine hohe Spezifität besaß, zeigten Enzymtests mit verschiedenen Ketoverbindungen, Zuckern, Zuckerderivaten, sowie Ketonen und Aldehyden. Von 69 getesteten Substraten setzte das Enzym aus *T. morbirosei* 23827 lediglich 5-Keto-D-Fruktose um und zeigte keine Oxidase-Aktivität mit Fruktose oder Arabinose, wie es bei den Ketofruktose-Reduktasen aus *G. cerinus* und *E. citreus* beobachtet worden ist, die auch die Oxidation von Fruktose oder Arabinose katalysieren, wenn Substrat und Reaktionsäquivalent in hohen Konzentrationen vorlagen (Avigad *et al.*, 1966; Schrimsher *et al.*, 1988; Englard und Avigad, 1975). Die hohen Affinität und Spezifität der Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei* 23827 gegenüber 5-Keto-D-Fruktose wurde, im Rahmen dieser Arbeit, für die Entwicklung eines neuen enzymatischen Nachweisverfahrens von 5-Keto-D-Fruktose genutzt. Die Detektionsgrenze der entwickelten Ketofruktose-Reduktase-Tests lag bei  $\sim 5 \mu\text{M}$  und aufgrund der hohen Spezifität des Enzyms konnten zu analysierende Proben ohne vorherige Aufbereitung oder Aufreinigung der 5-Keto-D-Fruktose in den Test eingesetzt werden. Mit dieser neu entwickelten Quantifizierungsmethode konnte 5-Keto-D-Fruktose in Konzentrationen von 5-15  $\mu\text{M}$  in verschiedenen Lebensmitteln, wie Honig und Holunderblütensirup, nachgewiesen werden (Vgl. Kap. 3.5.3.3). Die bisherige Quantifizierung von 5-Keto-D-Fruktose erfolgte vornehmlich mittels HPLC, was eine Aufbereitung der Proben, sowie eine lange Analysezeit mit Laufzeiten von  $>10$  min pro Probe beinhaltete. Zudem lag die Detektionsgrenze der HPLC im millimolaren Bereich. Die neu entwickelte, enzymatische Nachweismethode zur Detektion und Quantifizierung von 5-Keto-D-Fruktose hingegen benötigt keine Probenvorbereitung und kann innerhalb von wenigen Minuten durchgeführt werden (Vgl. Kap. 3.5.3.2). Aufgrund der hohen Sensitivität der Ketofruktose-Reduktase, können sehr geringe Konzentrationen von 5-Keto-D-Fruktose schnell und genau bestimmt werden.

#### **4.4.5 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus dem Disaccharid Saccharose**

Wie zuvor gezeigt wurde, konnte durch die Expression der, für den Fruktose-Dehydrogenase-Komplex kodierenden, Gene aus *G. japonicus* in *G. oxydans* 621H  $\Delta\text{hsdR}$ , der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta\text{hsdR}$  *fdh* generiert werden, der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose oxidieren konnte (vgl. Kapitel 3.5.1). Da *G. oxydans* 621H  $\Delta\text{hsdR}$  nicht über ein, für eine Ketofruktose-Reduktase kodierendes, Gen verfügt, wird die gebildete 5-Keto-D-Fruktose nicht wieder zu Fruktose reduziert, sondern es kommt zu einer Akkumulierung des Fruktose-Derivates im Medium. Um das System zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose weiterzuentwickeln, mit

dem Ausblick alternative Substrate für die Gewinnung von 5-Keto-D-Fruktose einsetzen zu können, wurde ein 2-Stamm-System entwickelt, mit dem 5-Keto-D-Fruktose aus dem Disaccharid Saccharose produziert werden kann. Saccharose besteht aus einem Molekül  $\alpha$ -D-Glucopyranose und einem Molekül  $\beta$ -D-Fruktofuranose, die über eine  $\alpha,\beta$ -1,2-glycosidische Bindung verknüpft sind. Die handelsüblichen Kosten von Saccharose und Fruktose als Feinchemikalien weisen keine bedeutenden Unterschiede auf. Der Marktpreis von gewöhnlichen Haushaltszucker jedoch, welcher >99 % Saccharose enthält, liegt bei ca. 0,7 Euro/kg und ist somit um ein Vielfaches günstiger als reine Fruktose oder reine Saccharose, deren Kilopreis zwischen 30 und 40 Euro liegt. Des Weiteren tritt Saccharose in hohen Konzentrationen als Speicherstoff in Pflanzen, wie beispielsweise Zuckerrüben, auf. Um Zuckerrüben oder sogenannte Agro-Abfälle der Zuckerrüben, die bei Aufreinigungsprozessen anfallen, für die Produktion von 5-Keto-D-Fruktose nutzen zu können, wurde ein System bestehend aus zwei *G. oxydans*-Stämmen generiert. Durch das entwickelte 2-Stamm-System konnte Saccharose hydrolysiert und die entstehende Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt werden. Somit würden, bei einer industriellen Anwendung des Systems, kostspielige Aufreinigungsverfahren zur Erzeugung reiner Substrate entfallen und die Produktion eines Süßstoffes aus pflanzlichen Rohmaterialien ermöglicht werden.

*G. oxydans* 621H besitzt keine Transporter zur Aufnahme von Di- und Trisacchariden ins Zellinnere und Polysaccharide können, aufgrund ihrer Größe, die äußere Membran nicht über die membranintegrierten Porine passieren. Außerdem verfügt *G. oxydans* 621H nicht über die notwendigen hydrolytischen Enzyme, die für die Metabolisierung von Di- und Polysacchariden benötigt werden. Daher sollte für die Spaltung der Saccharose im 2-Stamm-System ein, auf der von Kosciow *et al.* (2016) generierten Deletionsmutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* basierender, Stamm eingesetzt werden. Das Gen *goxI687*, das in dieser Mutante deletiert wurde, kodiert für das TolB-Protein, welches ein Teil des Tol-Pal-Komplexes bildet und für die Integrität der äußeren Membran verantwortlich ist (Lazzaroni *et al.*, 1999). Mit der Deletion des *tolB*-Gens wurde ein Stamm geschaffen, der eine durchlässige äußere Membran aufweist, sodass periplasmatische Proteine in den extrazellulären Raum diffundieren können. Durch das Einbringen des für eine extrazellulären Sucrase kodierenden Gens *sacC*, welches aus dem Organismus *Zymomonas (Z.) mobilis* stammt, wurde der Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *sacC* befähigt Saccharose in die Monosaccharide Glukose und Fruktose zu spalten (Kosciow, 2017). Bei einer Co-Kultivierung der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *sacC* und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh* in saccharosehaltigem Medium, würde das Disaccharid demnach durch die Sucrase

SacC in Glukose und Fruktose gespalten werden. Glukose könnte dann zum einen, durch die membranständige Glukose-Dehydrogenase, zu Glukonat umgesetzt werden, welches anschließend von der Glukonat-Dehydrogenase weiter zu 2- und 5-Ketoglukonat oxidiert wird. Zum anderen würde ein kleiner Teil der Glukose ins Cytoplasma aufgenommen werden, wo die Verbindung phosphoryliert wird und in den Pentosephosphatweg oder den Entner-Doudoroff-Weg einfließt. Die entstehende Fruktose könnte ebenfalls cytoplasmatisch metabolisiert, oder vom Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR fdh*, mit Hilfe der membranständigen Fruktose-Dehydrogenase, zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert werden. Versuche mit dem 2-Stamm-System und Saccharose als Substrat zeigten, dass das Disaccharid abgebaut und die entstandene Fruktose effizient zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt wurde. Von der, den Kulturen zur Verfügung stehende, Glukose wurde 59,4 % zu 2-Ketoglukonat oxidiert. Die anderen 40,6 % der Glukose flossen vermutlich in den Pentosephosphatweg und den Entner-Doudoroff-Weg ein und wurden über Pyruvat und Acetaldehyd zu Acetat umgesetzt oder für die Generierung von Zellmasse genutzt. In *G. oxydans* werden Wachstumssubstrate cytoplasmatisch primär über den Pentosephosphatweg abgebaut, der Entner-Doudoroff-Weg wird nur im geringen Maße genutzt (Matsushita *et al.*, 1994b; Olijve und Kok, 1979b; Deppenmeier und Ehrenreich, 2009). Dabei wird Glukose cytoplasmatisch phosphoryliert und das entstandene Glukose-6-Phosphat in den oxidativen Pentosephosphatweg eingespeist. Des Weiteren kann Glukose von der löslichen Glukose-Dehydrogenase (Gox2015) cytoplasmatisch zu Glukonat oxidiert werden, welches anschließend von der Glukonat-Kinase (Gox1709) phosphoryliert wird und ebenfalls in den oxidativen Pentosephosphatweg einfließt (Krajewski *et al.*, 2010; Richhardt *et al.*, 2012). Olijve und Kok (1979b) zeigten, dass der Weg der Verstoffwechslung abhängig vom pH-Wert des Mediums und der Konzentration der Glukose ist. Ab einem pH-Wert von 3,5 wird die Umsetzung der Glukose mit Hilfe des Pentosephosphatweges vollständig inhibiert. Bei einem pH-Wert von 5,5 und Glukosekonzentrationen >15 mM wird Glukose vornehmlich zu Glukonat oxidiert. Die Oxidation der Glukose zu Glukonat findet dabei hauptsächlich durch die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase statt und das entstandene Glukonat wird von der membranständigen Glukonat-Dehydrogenase zu 2-Ketoglukonat oxidiert, welches über Porine der äußeren Membran ins Medium abgegeben wird (Deppenmeier *et al.*, 2002). Lediglich ein kleiner Teil wird cytoplasmatisch durch die lösliche Glukose-Dehydrogenase zu Glukonat oxidiert. Fällt die Glukosekonzentration unter den Schwellenwert von 5-15 mM, wird Glukose vornehmlich über den Pentosephosphatweg metabolisiert. Da der  $K_M$ -Wert der membranständigen Glukose-Dehydrogenase bei  $5,9 \pm 0,34$  mM und der  $K_M$ -Wert der löslichen Glukose-

Dehydrogenase bei 13 mM liegt, ist die Oxidationsrate der Enzyme bei niedrigen Glukose-Konzentrationen gering (Meyer *et al.*, 2013; Pronk *et al.*, 1989). Glukose-Kinasen hingegen weisen  $K_M$ -Werte im Bereich von 0,1-0,8 mM auf, sodass die Verstoffwechslung der Glukose bei niedrigen Konzentrationen hauptsächlich über diese Enzyme läuft (Pronk *et al.*, 1989; Scopes *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1997). Diese Beobachtung wurde von Kosciow *et al.* (2014) bestätigt, die bei Wachstumsversuchen mit geringen Glukosekonzentrationen eine verstärkte Acetatbildung dokumentierten. Insgesamt fließen jedoch weniger als 10 % der Glukose in den Pentosephosphatweg ein (Krajewski *et al.*, 2010; Olijve and Kok, 1979a, b). Von der, im Medium enthaltenen und durch die Hydrolyse der Saccharose generierten, Fruktose wurden 91% durch das 2-Stamm-System zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert und 9 % zu Acetat umgesetzt oder für Biosyntheseprozesse verwendet. Richhardt *et al.* (2012) zeigten, dass in *G. oxydans* Fruktose vornehmlich über den Pentosephosphatweg metabolisiert wird und nur in sehr geringen Mengen in den Entner-Doudoroff-Weg einfließt. Basierend auf den Stämmen *G. oxydans* 621H  $\Delta hsdR \Delta 1687 sacC$  und *G. oxydans* 621H  $\Delta hsdR fdh$  ist es somit in dieser Arbeit gelungen ein System zu entwickeln, mit dem höchst effizient und mit einer durchschnittlichen Ausbeute von  $90,3 \pm 8,3 \%$ , 5-Keto-D-Fruktose aus dem Disaccharid Saccharose produziert werden konnte.

#### **4.4.6 Co-Expression der *fdh*-Gene und *sacC* in *G. oxydans* 621H $\Delta hsdR \Delta 1687$**

In einem nächsten Schritt sollte das 2-Stamm-System vereinfacht werden, indem durch die Co-Expression der *fdh*-Gene und *sacC* in der Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta hsdR \Delta 1687$ , die Spaltung von Saccharose und die Oxidation von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose in einem Stamm ermöglicht wird. Hierfür wurden drei verschiedene Expressionsplasmide erstellt, bei denen die *fdh*-Gene und *sacC* entweder unter der Kontrolle eines Promotors oder unter der Kontrolle separater Promotoren standen. Im ersten Ansatz wurden die Gene *fdhS*, *fdhL* und *fdhC* zusammen mit dem Gen *sacC* hinter dem *p264*-Promotor in *G. oxydans* 621H  $\Delta hsdR \Delta 1687$  exprimiert. Anschließende Wachstumsexperimente mit Saccharose als Kohlenstoffquelle zeigten, dass diese nicht umgesetzt wurde und der Stamm nicht in der Lage war mit Saccharose als Substrat zu wachsen (Vgl. Kap. 3.5.5.1). Dies deutet auf eine nicht erfolgte oder sehr geringe Produktion von SacC hin. Berücksichtigt man die niedrige spezifische Aktivität der Sucrase SacC von 1,2 U/mg (Kosciow, 2017), könnte bei einer geringen Menge an produzierter Sucrase SacC die Hydrolyse der Saccharose nicht schnell genug erfolgen, um ein Wachstum des Stammes zu ermöglichen. Da alle Gene unter der Kontrolle eines Promotors standen, wurde bei der Transkription wahrscheinlich ein Transkript erstellt, das sowohl die, für den Fruktose-Dehydrogenase-Komplex kodierenden,

Gene, als auch *sacC* umfasste. Bei langen mRNA-Sequenzen besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass es zur Ausbildung ungünstiger Sekundärstrukturen kommt, die eine inhibierende Wirkung auf die Translation haben können. Des Weiteren könnte eine geringe Halbwertszeit der mRNA zu einer schnellen Degradierung der Nukleinsäure führen (Baneyx, 1999; Kudla *et al.*, 2009). Der Versuch der simultanen heterologen Produktion mehrerer Proteine, kann aber auch zu Problemen bei der Proteinsynthese im Expressionsstamm führen, wodurch die Translation der Proteine nur eingeschränkt erfolgt (Baneyx und Mujacic, 2004; Rosano und Ceccarelli, 2014).

In zwei weiteren Ansätzen wurden daher Expressionsplasmide erstellt, bei denen die *fdh*-Gene und das Gen *sacC* unter der Kontrolle separater Promotoren standen. Dabei wurde zum einen eine zweite Promotorregion des *p264*-Promotors (Kallnik *et al.*, 2010) zwischen den für die Fruktose-Dehydrogenase kodierenden Genen und *sacC* eingefügt. Zum anderen wurde die Reversibilität des *p264*-Promotors genutzt, dessen Nukleotidsequenz in komplementär-reverser Richtung die Promotorregion (*p265*) des Gens *gox0265* kodiert und die Gene *fdhS*, *fdhL* und *fdhC* in komplementär-reverser Richtung in das Plasmid kloniert. Die Expressionsplasmide wurden in die Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* eingebracht und anschließend der Umsatz von Saccharose und Fruktose an ruhenden Zellen gemessen (Vgl. Kap. 3.5.5.2). Saccharose wurde von Zellen, die das Expressionsplasmid pBBR1p264sacCp264fdh besaßen, das über zwei separate *p264*-Promotorregionen verfügte, zu 53 % abgebaut. Von der, aus der Spaltung der Saccharose entstandenen, Glukose wurden 73,7 % zu 2-Ketoglukonat oxidiert; die restlichen 27,3 % akkumulierten im Medium. Zudem konnten 92 % der, aus der Hydrolyse der Saccharose generierten Fruktose, im Medium detektiert werden und lediglich 8 % wurden zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert. Mit Fruktose als Substrat konnte hingegen ein Umsatz von 57,4 % beobachtet werden, wobei 67,4 % der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert und 9,8 % der Fruktose zu Acetat metabolisiert wurde. Die Hydrolyse der Saccharose, sowie die Bildung von 5-Keto-D-Fruktose zeigten, dass sowohl die Sucrase SacC, als auch der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex produziert wurden und aktiv in den Zellen vorlagen. Wurde Saccharose als Substrat eingesetzt, war die 5-Keto-D-Fruktose-Bildung (8 %) sehr gering. Ein Grund dafür könnte die geringe Aktivität von SacC sein. Läuft die Spaltung der Saccharose langsam ab, sind die Konzentrationen an gebildeter Fruktose sehr niedrig. Da der  $K_M$ -Wert der Fruktose-Dehydrogenase bei 10 mM liegt (Ameyama *et al.*, 1981), würde der Umsatz der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose bei Fruktosekonzentrationen  $\leq$  10 mM langsam ablaufen bzw. nicht erfolgen. Hinzu kommt, dass Fruktose von *G. oxydans* ebenfalls zur Biosynthese genutzt und über bisher noch nicht



identifizierte Transporter ins Cytoplasma aufgenommen wird (Richhardt *et al.*, 2012). Ist die Affinität der Fruktose-Transporter höher als die Affinität der Fruktose-Dehydrogenase gegenüber Fruktose, würde Fruktose bei geringer Konzentration vornehmlich ins Cytoplasma transportiert und nicht periplasmatisch oxidiert werden. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Versuche mit ruhenden Zellen und Fruktose als Substrat unterstützt. Da nach 24 h noch eine Fruktosekonzentration von 9,4 mM im Überstand detektierbar war, scheint der Umsatz von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose bei Konzentrationen unter 10 mM sehr langsam abzulaufen oder zum Erliegen zu kommen. Da von den 12,7 mM Fruktose, die umgesetzt wurden, 8,6 mM nachweislich zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert worden waren, scheint bei höheren Fruktosekonzentrationen die Oxidation von Fruktose durch die Fruktose-Dehydrogenase favorisiert zu werden. Die Aufnahme und Verstoffwechslung von Fruktose im Cytoplasma, die zur Bildung von Acetat führt, findet hingegen verstärkt bei geringeren Fruktosekonzentrationen statt, da der  $K_M$ -Wert der cytoplasmatischen Kinasen um ein 10-faches unter dem  $K_M$ -Wert der Fruktose-Dehydrogenase liegt und die Fruktose-Dehydrogenase bei Fruktosekonzentrationen unter 10 mM sehr geringe bis keine Aktivität aufweist. Dies weist Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen Studien von Olijve und Kok (1979 a, b) auf, wo gezeigt wurde, dass Glukose bei niedrigen Konzentrationen von 5-15 mM vornehmlich über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird.

Im Fall des dritten Expressionsplasmids, bei dem die für die Fruktose-Dehydrogenase kodierenden Gene unter der Kontrolle des komplementär, revers kodierten *p265*-Promotors und *sacC* unter der Kontrolle des *p264*-Promotors lagen, zeigten Versuche mit ruhenden Zellen ähnliche Ergebnisse (Vgl. Kap. 3.5.5.3). Bei Verwendung von Saccharose als Substrat wurde das Disaccharid von den ruhenden Zellen vollständig abgebaut und die Glukose-Äquivalente wurden zu 2-Ketoglukonat oxidiert. Die, durch die Hydrolyse der Saccharose entstandene, Fruktose wurde zu 73 % umgesetzt, wobei 17 % zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert und 83 % zu Acetat verstoffwechselt wurden. Mit Fruktose als Substrat, erfolgte ein Umsatz der Fruktose von 70 %, wobei 25 % zu 5-Keto-D-Fruktose und 67 % zu Acetat verstoffwechselt wurden. Auch hier konnte beobachtet werden, dass 5-Keto-Fruktose eher gebildet wurde, wenn die als Substrat zu Verfügung stehende Fruktosekonzentration über dem  $K_M$ -Wert der Fruktose-Dehydrogenase lag. Die Bedingungen und Durchführung der Experimente mit ruhenden Zellen zur Analyse der unterschiedlichen Expressionsplasmide waren identisch. Dennoch konnte lediglich bei Expressionen der Gene unter der Kontrolle der Promotoren *p264* und *p265* ein vollständiger Abbau der Saccharose beobachtet werden. Dies könnte auf eine stärkere Produktion der Sucrase SacC bei Verwendung des

Expressionsplasmids mit den Promotoren *p264* und *p265* hindeuten, als bei der Expression mit dem Plasmid, das zwei *p264*-Promotoren aufwies. Auf der anderen Seite wurde bei der Co-Expression aller Gene unter der Verwendung zweier *p264*-Promotoren die als Substrat verwendete Fruktose effizienter zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt, was auf eine höhere Menge an produzierter Fruktose-Dehydrogenase hindeuten könnte, als bei Expression der Gene unter der Kontrolle der Promotoren *p264* und *p265*. Um eine genaue Aussage bezüglich der Unterschiede der Expressionsstärke der Gene unter Einfluss der verschiedenen Promotoren tätigen zu können, müssten Expressionsanalysen mit den konstruierten Plasmiden zur Co-Expression von *sacC* und den *fdh*-Genen durchgeführt werden. Jedoch konnte mit keinem der Plasmide eine genügend hohe Co-Produktion der Sucrase SacC, sowie des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* erzielt werden, welche eine effiziente Umwandlung von Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose ermöglicht hätte. Somit ist eine weitere Analyse der Expressionsstärke der Plasmide irrelevant, da diese sich nicht für die Erstellung eines 1-Stamm-Systems zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose in industriellem Maßstab eignen. Da, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die heterologe Produktion von Proteinen in *G. oxydans* oft problembehaftet ist (Vgl. Kap. 3.2.2, Kap. 3.3.2 u. Kap. 3.3.3), kann die simultane Produktion von vier Proteinen in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* zu einer Überlastung des Proteinbiosyntheseapparates geführt haben, sodass SacC und die Fruktose-Dehydrogenase nur in geringen Mengen produziert wurden. Da es sich bei dem Expressionsstamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* um eine TolB-defiziente Mutante handelt, könnte die durchlässige äußere Membran der Mutante zusätzlich zu Problemen bei der Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes führen. Die Untereinheiten FdhS und FdhL des Komplexes sind lediglich über die Cytochrom *c*-Untereinheit an der cytoplasmatischen Membran verankert. Dass diese Interaktion nicht sonderlich stark ist, konnte bei der Aufreinigung des Proteinkomplexes gezeigt werden, bei der zwar eine Co-Isolierung der großen und der kleinen Untereinheit erfolgte, das Cytochrom *c* jedoch nicht mit der FdhS/FdhL-Einheit aufgereinigt werden konnte. Besteht also lediglich eine lockere Bindung zwischen FdhL/FdhS und FdhC, könnte die durchlässige äußere Membran der  $\Delta$ *I687*-Mutante dazu führen, dass ein Teil der FdhS/FdhL-Einheiten aus der Zelle diffundieren und somit inaktiv vorliegen.

Diese Hypothese konnte durch Aktivitätstests mit den Membranen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *fdh* bestätigt werden. Die Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase in den Membranen der Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *fdh* betrug mit 0,1 U/mg Membranprotein lediglich 5 % der, im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh*,

gemessenen Aktivität. Nicht nur die Aktivität der Fruktose-Dehydrogenase war in der Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *fdh* um ein 20-faches geringer verglichen mit dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh*. Auch die Aktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase (Gox1067–1068, Gox0756) und der Polyol-Dehydrogenase (Gox0854–0855) waren um ein 35-faches und ein 2,4-faches geringer als in den Membranen des Stammes *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh*. Im Gegenzug dazu war die Aktivität der Glukose-Dehydrogenase (Gox0265) in der *tolB*-Mutante um ein vier-faches höher als in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* *fdh*. Auffallend war, dass die membranständigen Dehydrogenasen, die eine geringere Aktivität in der Mutante *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I68* *fdh* aufwiesen, aus mehreren Untereinheiten bestanden. Sowohl die Fruktose-Dehydrogenase, als auch die Alkohol-Dehydrogenase bestehen aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, sowie einem Cytochrom *c*, welches in die cytoplasmatische Membran integriert ist und gleichen sich somit in ihrem Aufbau (Yakushi und Matsushita, 2010; Shinagawa *et al.*, 1982; Adachi *et al.*, 1978). Bestünde bei der Alkohol-Dehydrogenase ebenfalls eine schwache Bindung zwischen den membranintegrierten Cytochromen und den restlichen Proteinuntereinheiten, könnte auch hier eine Diffusion der großen und der kleinen Untereinheit aus der Zelle zu einer geringeren Aktivität der Enzymkomplexe führen. Die Polyol-Dehydrogenase besteht hingegen aus zwei Untereinheiten SldA und SldB und ist PQQ-abhängig. Im Gegensatz zur Alkohol- und Fruktose-Dehydrogenase besitzt die Polyol-Dehydrogenase keine dritte Cytochrom *c*-Einheit, sondern ist über die SldB-Untereinheit in der cytoplasmatischen Membran verankert (Ameyama *et al.*, 1985b; Voss *et al.*, 2010). Dass die Aktivität der Glukose-Dehydrogenase im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* *fdh* erhöht war, könnte im Zusammenhang mit der verminderten Integrität der äußeren Membran stehen. Da die Glukose-Dehydrogenase ein Schlüsselenzym im oxidativen Stoffwechsel von *G. oxydans* ist, könnte deren Expression unter Stressbedingungen basierend auf der durchlässigen äußeren Membran hochreguliert werden. Des Weiteren besteht die Glukose-Dehydrogenase lediglich aus einer Proteineinheit und nicht wie viele andere membranständigen Dehydrogenasen aus mehreren Untereinheiten, sodass in der *tolB*-Mutante ein vermehrter Einbau des Enzyms, basierend auf strukturellen Vorteilen, in die cytoplasmatische Membran erfolgen könnte.

Da die Vereinfachung des 2-Stamm-Systems durch die Co-Produktion des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes und der Sucrase SacC im Stamm *G. oxydans* 621  $\Delta$ *hsdR*  $\Delta$ *I687* nicht die nötige Effizienz für eine Anwendung im industriellen Maßstab aufwies, wurde im letzten Teil der Arbeit der Fokus auf die Weiterentwicklung des 2-Stamm-Systems zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus natürlichen Rohstoffen gelegt. Die Produktion

industriell interessanter Produkte mit Hilfe von Mischkulturen ist ein weit verbreitetes Forschungsgebiet und es gibt bereits industriell etablierte Syntheseprozesse, bei denen Fermentationsschritte durch den Einsatz von Mischkulturen durchgeführt werden. In der Vitamin C-Synthese beispielsweise wird seit 1970 die Umsetzung von L-Sorbitol zu Keto-Gulonsäure mit Hilfe einer Mischkultur aus *K. vulgare* und *Bacillus*-Stämmen ausgeführt. Im Bereich der Enzymproduktion sind viele Studien bekannt, bei denen die Verwendung von Co-Kulturen die Enzymausbeute steigern konnte, ebenso wie bei der Produktion von Geschmacks- und Aromastoffen (Vandamme und Soetaert, 2002; Banerjee *et al.*, 2005; Hyun und Zeikus, 1985). Auch in der Fermentation von Lebensmittelprodukten wie Käse, Kefir oder Sauerkraut ist der Einsatz bakterieller Mischkulturen etabliert und dient zur Geschmacksentwicklung und zur Texturerhaltung (Martin *et al.*, 2001; Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006). In Hinblick auf ein zunehmendes Umweltbewusstsein, liegt ein Hauptaugenmerk industrieller Forschung auf der Gewinnung von Nutstoffen aus Bioabfällen, vor allem im Bereich der erneuerbaren Energien und der Verwertung sogenannter Agro-Abfälle. Ali *et al.*, (2016) zeigten, dass die Verwendung einer Co-Kultur aus *Aspergillus oryzae* und *Alternaria alternata* die Produktion von Zitronensäure aus organischen Abfällen, wie Apfelreste oder Erdnussschalen, steigern kann, verglichen mit der Fermentation durch lediglich einen der beiden Stämme. Die Gewinnung von Bioethanol aus Stärke oder Cellulose in Form von pflanzlichen Rohstoffen ist ebenfalls ein Forschungsbereich bei denen Synthesysteme basierend auf Co-Fermentationen unterschiedlicher Mikroorganismen entwickelt werden, ebenso wie die Generierung von Biokunststoffen, die biologisch abbaubar sind (Talabardon *et al.*, 2000; Hyun und Zeikus, 1985; Dias *et al.*, 2006). Die Etablierung eines 2-Stamm-Systems zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus biologisch nachwachsenden Rohstoffen wie Zuckerrüben wäre somit von großem, industriellem Interesse und Ziel dieser Arbeit.

#### **4.4.7 Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrüben**

Saccharose ist der Hauptspeicherstoff vieler Pflanzen, unter anderem von Zuckerrohr und Zuckerrüben (Giaquinta, 1979; Zhu *et al.*, 1997; Chapin *et al.*, 1990). Die Gewinnung von Zuckerstoffen aus Zuckerrohr geht bis ins 3.-5. Jahrhundert nach Christi zurück und hat ihren Ursprung in Indien. 1741 entdeckte der deutsche Chemiker A. S. Marggraf, dass der Zucker der Zuckerrübe mit dem aus Zuckerrohr gewonnenem Zucker chemisch identisch ist und 1799 erfolgte erstmals die Isolierung dieses als Saccharose bezeichneten Zuckers aus der Zuckerrübe. Im Jahr 1802 nahm dann die erste Zuckerfabrik im damaligen Preußen ihren Betrieb auf und heute ist Deutschland einer der Hauptproduzenten von raffiniertem Zucker aus Zuckerrüben (Lippmann, 1929; Baxa, 1937; Schiweck, 1983). Die Zuckerrübe, *Beta*

*vulgaris altissima*, ist eine zwei-jährige Pflanze, die im ersten Jahr geerntet und verarbeitet wird, da hier der Saccharoseanteil der Rübe am höchsten ist. Der Trockenmasseanteil der Rübe besteht zu 75-78 % aus Saccharose, was etwa 20 % des Feuchtgewichts entspricht (Panella, 2010; Wyse, 1979). Bei der Prozessierung von Zuckerrüben zur Zuckerextraktion werden diese zunächst zerkleinert und die in den Zellen enthaltene Saccharose mittels Gegenstromextraktion aus den Pflanzenzellen gelöst. Die Denaturierung der Zellen wird dabei durch die Erhitzung des Zuckerrübenbreis auf 70-75 °C herbeigeführt, sodass die Zellwände der Pflanzenzellen zwar aufgebrochen werden, Zellwandbestandteile jedoch nicht im Wasser in Lösung gehen. Der so gewonnene Rohsaft enthält einen Trockensubstanzanteil von ca. 15 %, von dem ca. 12,5 % Saccharose bildet, 1 % andere Zucker wie Fruktose, Glukose, Trisaccharide und Raffinose darstellen und etwa 1,5 % unter anderem Polypeptide, Pektin, organische Säuren, Aminosäuren, Vitamine, Betain und verschiedene Salze und Ionen ausmachen. Um bakterielle Kontaminationen des Rohsaftes zu vermeiden wird dieser mit 30-40 %-igem Formaldehyd behandelt, das bei Bedarf in Stößen dazugegeben wird. Bei der anschließenden Saftreinigung werden mehrere Kalkungsschritte durchgeführt, bei denen der Rohsaft mit Kalk und Kohlendioxid versetzt wird, die zur Fällung von Nicht-Zucker-Substanzen führen. Der dabei entstehende Schlamm wird durch Dekantieren abgetrennt und der Saft gefiltert und eingedampft (Schiweck, 1983; Reinefeld *et al.*, 1982). Die so erhaltene Kristallisationsmasse, auch Magma genannt, weist bereits einen hohen Reinheitsgrad auf. Dennoch enthält die Kristallisationsmasse Raffinose, die einen prozentualen Anteil von >1% der Trockenmasse ausmacht und vor der Kristallisation des Zuckers entfernt werden muss. Raffinose verringert die Kristallisationsgeschwindigkeit der Saccharose und führt zur Ausbildung nadelförmiger Kristallen. Der Abbau der Raffinose erfolgt durch Behandlung der Kristallisationsmasse mit  $\alpha$ -Galaktosidasen, die das Trisaccharid Raffinose in Saccharose und Galaktose spalten (Linden, 1982). Anschließend nach weiteren Waschschrinen und erfolgter Kristallisierung des Zuckers, liegt die Saccharose mit einer Reinheit von 99,95 % vor.

Wie zuvor gezeigt werden konnte, kann mit Hilfe des 2-Stamm-System Saccharose, mit einer durchschnittlichen Ausbeute von  $90,3 \pm 8,6\%$ , effizient zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt werden (Vgl. Kap. 3.5.4). Um das System für industrielle Maßstäbe zugänglich zu machen, wurden Experimente zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrübenextrakt durchgeführt. Hierfür wurden Zuckerrüben, ähnlich wie bei der industriellen Zuckerproduktion, zerkleinert und mit Wasser versetzt und anschließend die in den Zuckerrübenzellen enthaltene Saccharose durch Autoklavieren freigesetzt. Zur Entfernung von Pflanzenzellstoffen und fester Partikel wurde der Zuckerrübenbrei gesiebt und

ausgepresst und der erhaltene Extrakt als Substrat im 2-Stamm-Fermentations-System eingesetzt. HPLC-Analysen zeigten eine anfängliche Saccharosekonzentration von 232,4 mM, sowie Anteile von Fruktose (19,4 mM) und Glukose (24,8 mM) im Zuckerrübenextrakt. Nach siebentägiger Inkubation der Stämme *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR  $\Delta$ 1687 sacC und *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hsdR fdh mit dem Rübenextrakt waren 90,8 % der Saccharose abgebaut. Von der den Stämmen zur Verfügung stehenden Glukose wurde 96,6 % metabolisiert, davon wurden 77,3 % zu 2-Ketoglukonat, 6,6 % zu 5-Ketoglukonat und 16,1 % zu Acetat umgesetzt oder für Biosyntheseprozesse genutzt. 5-Ketoglukonat entsteht durch die cytoplasmatische Oxidation von Glukonat durch die lösliche Glukonat-Dehydrogenase Gox2187 oder periplasmatisch durch die membranständige Glycerol-Dehydrogenase SldAB, die neben vielen anderen Substraten auch Glukonat umsetzen kann (Prust *et al.*, 2005; De Muynck *et al.*, 2007). Die im Medium enthaltene und durch die Spaltung der Saccharose freigesetzte Fruktose wurde zu 98,2 % verstoffwechselt, wovon 85 % zu 5-Keto-D-Fruktose oxidiert und 15 % cytoplasmatisch zu Acetat umgesetzt wurden. Um den pH-Wert der Fermentationskultur stabil zwischen pH 5 und pH 6,5 zu halten, wurde der Mischkultur CaCO<sub>3</sub> hinzugefügt, sobald der pH unter einen Wert von 5 fiel. Dabei war deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von CaCO<sub>3</sub> zu einem Anstieg der Produktbildungsraten von 5-Keto-D-Fruktose und 2-Ketoglukonat führte. Somit scheint ein pH-Wert zwischen 5 und 6 optimal für den Ablauf der periplasmatischen Oxidationen in *G. oxydans* zu sein. Diese Beobachtung stimmte mit Untersuchungen von (Ameyama *et al.*, 1978) und Matsushita *et al.* (1990) überein, die zeigen konnten, dass der optimale pH-Wert für die Bildung von 2-Ketoglukonat aus Glukonat im leicht sauren Bereich bei einem pH-Wert von 6 liegt. Englard und Avigad (1965) führten Untersuchungen zur Bildung von 5-Keto-D-Fruktose mit ruhenden Zellen des Organismus *G. cerinus* durch und fanden, dass die optimale Bildungsrate bei einem pH-Wert von 4-4,2 erreicht wird. Kawai *et al.* (2013) zeigten zudem, dass das pH-Optimum der aufgereinigten Fruktose-Dehydrogenase aus *G. japonicus* bei 6 und das pH-Optimum des Enzymkomplexes bei Integration in der Membran bei pH 4 liegt. Da bei der Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrübenextrakt weitaus komplexere interzelluläre Reaktionen ablaufen, als bei Messungen mit ruhenden Zellen unter Verwendung lediglich eines Substrates oder bei enzymatischen Messungen am aufgereinigten Protein, kann die leichte Verschiebung des pH-Optimums der Fruktose-Dehydrogenase von pH 4 auf pH 5-6 auf die physiologischen Bedingungen im Experiment zurückgeführt werden. Neben der hohen Effizienz der Umwandlung von Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose, bietet das 2-Stamm-System einen weiteren Vorteil. Eines der unerwünschten Nebenprodukte, die bei der Produktion von Zucker

aus Zuckerrüben anfällt ist das Trisaccharid Raffinose. Die extrazelluläre Sucrase SacC, die im 2-Stamm-System genutzt wird um Saccharose zu spalten, kann zudem Raffinose als Substrat nutzen und diese zu Melibiose und Fruktose umsetzen (O'Mullan *et al.*, 1992). Somit würde eine spätere  $\alpha$ -Galaktosidase Behandlung von 5-Keto-D-Fruktose im Aufreinigungsprozess entfallen und zudem auch die im Rübenextrakt anteilig vorhandene Raffinose zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose genutzt werden.

*G. oxydans* nutzt Mannitol als kompatibles Solut zum Schutz bei osmotischem Stress (Zahid *et al.*, 2015). Eine Steigerung der Umsatzraten könnte somit durch die Zugabe von geringen Mengen Mannitol ins Medium gesteigert werden. Zahid *et al.* (2015) führten Wachstumsexperimente mit *G. oxydans* in Glukose-haltigem Medium durch und erzeugten durch die Zugabe von Saccharose in Konzentrationen von 150-600 mM einen osmotischen Stresszustand der Zellen, was zu einer starken Zunahme der Verdopplungszeit des Stammes von 1,5 h auf 3,6 h führte. Durch die Zugabe von 5 mM Mannitol, konnte bei Saccharose-Konzentrationen bis zu 300 mM eine Kompensation des osmotischen Stresses herbeigeführt werden und keine Wachstumsunterschiede zwischen gestressten und nicht gestressten Zellen beobachtet werden. Des Weiteren zeigten Kulturen, die mit 1 M Glukose kultiviert wurden, bei Zugabe von 5 mM Mannitol eine 2,3-fache Steigerung der Glukonatbildung (Zahid *et al.*, 2015). Da die hohen Zuckerkonzentrationen im Zuckerrübenextrakt, sowie die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  den osmotischen Stress der Kulturen des 2-Stamm-Systems erhöhen, könnte die Zugabe von Mannitol diesen Stress reduzieren und somit zu einer Steigerung der Produktbildung führen. Für die Anwendung des Systems im industriellen Maßstab müsste der Fermentationsschritt, bei dem die Umsetzung von Saccharose zu 5-Keto-D-Fruktose mit Hilfe des 2-Stamm-Systems stattfindet, zwischen die Gewinnung des Rohsaftes und die anschließende Aufreinigung und Kristallisation des Zuckers geschaltet werden. Des Weiteren wäre es möglich die, bei der Kristallisation als Nebenprodukt anfallende Melasse, als Substrat für die Gewinnung von 5-Keto-D-Fruktose einzusetzen, da diese ein restliches Saccharosegehalt von 1,5-2 % aufweist. Allerdings kann Melasse Rückstände an Pflanzenschutzmitteln enthalten, die eine inhibierende Wirkung auf das Bakterienwachstum haben könnten (Schiweck, 1983). Der Einsatz von Magma und Melasse zur Produktion anderer industriell interessanter Produkte wie Bioethanol ist bereits ein weit erforschtes Gebiet und auch in der Biogasproduktion werden Nebenprodukte der Zuckerproduktion als Substrate verwendet (Dodić *et al.*, 2009; Czaja *et al.*, 2006; Kryvoruchko *et al.*, 2009; Razmovski und Vučurović, 2012). Im Bereich der Produktion eines Süßstoffes aus der Zuckerrübenverarbeitung gibt es jedoch bis jetzt keine veröffentlichten Studien. Somit bildet

das in dieser Arbeit entwickelte System zur Produktion von 5-Keto-D-Fruktose aus Zuckerrübenrohsaft einen komplett neuartigen Ansatz in der industriellen Nutzung von Zuckerrüben. Durch die hohe Effizienz des Systems, verbunden mit geringen Nebenkosten bezüglich der Kultivierungsmethodik, könnte das 2-Stamm-System von großem industriellem Wert für die Erschließung eines neuartigen Süßungsmittel darstellen. Zudem müssten keine neuen industriellen Prozesse entwickelt werden, sondern lediglich ein Zwischenschritt in den bereits etablierten Prozesstechniken der Zuckerrübenverarbeitung integriert werden. Die Aufbereitung der Zuckerrüben, sowie die Aufreinigung des Süßstoffes könnte mit Hilfe bereits bestehender Verfahrenstechniken durchgeführt werden.



## 5) Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung unbekannter PQQ- und FAD-abhängiger Oxidoreduktasen, deren regiospezifische Umsetzung von Substraten in Hinblick auf die Entwicklung biotechnologischer Applikationen ein großes industrielles Potential aufweist. Über BlastP-Analysen wurden 19 nicht charakterisierte Oxidoreduktasen aus unterschiedlichen  $\alpha$ -Proteobakterien zur Produktion und Charakterisierung ausgewählt. Fünf der elf cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen PQQ- und FAD-abhängigen Oxidoreduktasen konnten im Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* oder im Stamm *G. oxydans* BP.9 produziert und aufgereinigt werden, zeigten jedoch mit den getesteten Substraten keine Aktivität. Expressionsstudien belegten, dass die auf den Expressionsplasmiden kodierten Gene transkribiert wurden, auch wenn kein Protein nachgewiesen werden konnte. Nachfolgende Untersuchungen mit dem Modellproteins YliI, einer Aldose-Dehydrogenase aus *E. coli* belegten, dass die Inaktivität der Proteine auf einer inkorrekten Faltung und nicht auf der Substratwahl beruhte. Anschließende Translokationsanalysen am Beispiel von Acry1741 bestätigten, dass der Transport des periplasmatischen Enzyms über die Cytoplasmamembran nicht erfolgte und das Protein fehlgefaltet und inaktiv vorlag. Der anschließende Austausch der nativen Signalsequenz durch die Signalsequenzen pelB und SP2219 zeigte keine Verbesserung der Translokationseffizienz.

Von den sieben ausgewählten membranständigen Dehydrogenasen konnten vier erfolgreich in *G. oxydans* BP.9 produziert werden. Bei Aktivitätstest an Membranen konnten die Dehydrogenasen Ap9076 und Ap9346 aus *A. pasteurianus* als eine Aldose-Dehydrogenase und als Glukose-Dehydrogenase mit breitem Substratspektrum identifiziert werden. Ap9346 zeigte die höchste Aktivität mit Glukose. Des Weiteren setzte Ap9346 eine Vielzahl von Alkoholen, Polyole, Aldehyde und Diolen um. Die Aldose-Dehydrogenase Ap9076 wies ebenfalls die höchste Aktivität mit Glukose auf und oxidierte eine Reihe von Aldosen, wie Alloose und Fucose. Die Identifizierung von neuartigen, PQQ-abhängigen Enzymen ist in Bezug auf deren Spezifität und Regioselektivität von großem industriellem Interesse. In Hinblick auf die hohen Aktivitäten der Glukose-Dehydrogenase Ap9076 könnte dieses Enzym beispielsweise in der Weiterentwicklung von Biosensoren bzw. in der Etablierung von Glukosesensoren basierend auf membrangebundenen Dehydrogenasen Einsatz finden.

Des Weiteren konnte der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex aus *G. japonicus* in *G. oxydans* 621H  $\Delta$ *hsdR* produziert werden, der Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose, einem potentiellen,

neuen Süßstoff, oxidiert. Die Untereinheiten FdhS und FdhL des Proteinkomplexes konnten co-isoliert werden und wiesen eine spezifische Aktivität von  $127 \pm 7,7$  U/mg auf. Die Fruktose-Dehydrogenase-Aktivität in den Membranen des Expressionsstamms *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR fdh lag ein 33-faches höher als in *G. japonicus*. Versuche zur Umsetzung von Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose mit wachsenden Zellen zeigten, dass *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR fdh Fruktose mit einer durchschnittlichen Ausbeute von  $92,5 \pm 2\%$  zu 5-Keto-D-Fruktose oxidierte. Das vom Kulturüberstand aufgezeichnete  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum identifizierte das Oxidationsprodukt eindeutig als 5-Keto-D-Fruktose. In einem nächsten Schritt wurde eine Quantifizierungsmethode zum Nachweis von 5-Keto-D-Fruktose entwickelt basierend auf dem Enzym Ketofruktose-Reduktase aus *T. morbirosei*, für das eine maximale Aktivität von  $777,2 \pm 8,2$  U/mg und ein  $K_M$ -Wert für 5-Keto-D-Fruktose von  $4 \pm 0,1$  mM bestimmt werden konnte. Diese neue, enzymatische Nachweismethode weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, sodass keine vorherige Probenaufbereitung notwendig ist und 5-Keto-D-Fruktose-Konzentrationen im mikromolaren Bereich nachgewiesen werden können. Mit Hilfe des neuen Systems konnte 5-Keto-D-Fruktose in verschiedenen Honigsorten und Holunderblütensirup detektiert werden.

Zur Weiterentwicklung des Produktionsverfahrens von 5-Keto-D-Fruktose wurde ein 2-Stamm-System entwickelt, welches den Gebrauch von Saccharose als Substrat zur Generierung von 5-Keto-D-Fruktose ermöglicht. Saccharose ist in Form von Haushaltszucker um ein Vielfaches kostengünstiger als Fruktose und kommt in hohen Konzentrationen als Speicherstoff in Pflanzen vor. Mit Hilfe des 2-Stamm-Systems, bestehend aus dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ hdsR fdh und dem Stamm *G. oxydans* 621H  $\Delta$ I687 sacC, der die Saccharose hydrolysierende Sucrase SacC aus *Z. mobilis* produziert (Kosciow, 2017), konnte Saccharose mit einer durchschnittlichen Ausbeute von  $90,3 \pm 8,6\%$  zu 5-Keto-D-Fruktose umgewandelt werden. In einem letzten Schritt wurde das 2-Stamm-System an industrielle Maßstäbe angepasst. Da 75-78 % der Trockensubstanz der Zuckerrübe aus Saccharose besteht, eignet sich der pflanzliche Rohstoff als Substrat zur 5-Keto-Fruktose-Produktion. Dem industriellen Vorgehen der Saccharose-Extraktion zur Zuckergewinnung nachempfunden, wurde ein Zuckerrübenextrakt erstellt und als Substrat zur 5-Keto-D-Fruktose-Produktion eingesetzt. Wachstumsversuche auf Zuckerrübenextrakt zeigten, dass die im Zuckerrübenextrakt enthaltene Saccharose durch das 2-Stamm-System mit einer durchschnittlichen Effizienz von  $82 \pm 5\%$  zu 5-Keto-D-Fruktose umgesetzt wird. Die Entwicklung eines effizienten, bakteriellen Systems zur Produktion des potentiellen Süßstoffes 5-Keto-D-

Fruktose aus Fruktose, Saccharose und Zuckerrübenextrakt führte zu Anmeldung eines Patents (EP17175730.5).

## 6) Literaturverzeichnis

- Adachi, O.; Fujii, Y.; Ghaly, M. F.; Toyama, H.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. (2001): Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65 (12), S. 2755–2762.
- Adachi, O.; Moonmangmee, D.; Toyama, H.; Yamada, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. (2003): New developments in oxidative fermentation. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (6), S. 643–653.
- Adachi, O.; Tayama, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Ameyama, M. (1978): Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (11), S. 2045–2056.
- Aida, K.; Yamada, Y. (1964): A New Enzyme, 5-Ketofructose Reductase. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 28 (1), S. 74–75.
- Ali, S.; Anwar, Z.; Irshad, M.; Mukhtar, S.; Warraich, N. T. (2016): Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agro-wastes. In: *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 9 (1), S. 57–62.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST. A new generation of protein database search programs. In: *Nucleic Acids Research* 25 (17), S. 3389–3402.
- Ameyama, M.; Adachi, O. (1982): D-Fructose dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*, membrane-bound. In: *Methods in Enzymology* (89), S. 154–159.
- Ameyama, M.; Nonobe, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1985a): Method of enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone. In: *Analytical Biochemistry* 151 (2), S. 263–267.
- Ameyama, M.; Nonobe, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Takimoto, K.; Adachi, O. (1986): Purification and characterization of the quinoprotein D-glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (1), S. 49–57.
- Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1981a): D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*. Purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. In: *Journal of Bacteriology* 145 (2), S. 814–823.
- Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1981b): D-glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*. Solubilization, Purification and Characterization. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 45 (4), S. 851–861.
- Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1985b): Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (4), S. 1001–1010.
- Ameyama, M.; Tayama, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1978): New Enzymatic Determination of D-gluconate with Particulate D-gluconate Dehydrogenase. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (12), S. 2347–2354.

- Ano, Y.; Hours, R. A.; Akakabe, Y.; Kataoka, N.; Yakushi, T.; Matsushita, K.; Adachi, O. (2017): Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of D-pentonates to 4-keto-D-pentonates, D-fructose to 5-keto-D-fructose, and D-psicose to 5-keto-D-psicose. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 81 (2), S. 411–418.
- Anthony, C. (2001): Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 3 (5), S. 757–774.
- Armstrong, J. (1964): The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* 86 (1), S. 194–197.
- Arslan, E.; Schulz, H.; Zufferey, R.; Künzler, P.; Thöny-Meyer, L. (1998): Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251 (3), S. 744–747.
- Asakura, A.; Hoshino, T. (1999): Isolation and Characterization of a New Quinoprotein Dehydrogenase, L-Sorbose/L-Sorbose Dehydrogenase. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63 (1), S. 46–53.
- Avigad, G.; England, S. (1965): 5-Keto-D-fructose. I. Chemical characterization and analytical determination of the dicarbonylhexose produced by *Gluconobacter cerinus*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240, S. 2290–2296.
- Avigad, G.; England, S. (1968): 5-Keto-D-fructose. V. Phosphorylation by yeast hexokinase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 243 (7), S. 1511–1513.
- Avigad, G.; England, S.; Pifko, S. (1966): 5-Keto-D-fructose. IV. A specific reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked reductase from *Gluconobacter cerinus*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 241 (2), S. 373–378.
- Balkwill, David L.; Fredrickson, J. K.; Romine, M. F. (2006): *Sphingomonas* and Related Genera. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Stackebrandt, Erko: *Proteobacteria*. Delta and Epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria. New York, NY: Springer New York, S. 605–629.
- Banerjee, R.; Mukherjee, G.; Patra, K. C. (2005): Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. In: *Bioresource Technology* 96 (8), S. 949–953.
- Baneyx, F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In: *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5), S. 411–421.
- Baneyx, F.; Mujacic, M. (2004): Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. In: *Nature Biotechnology* 22 (11), S. 1399–1408.
- Bashton, M.; Chothia, C. (2002): The geometry of domain combination in proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 315 (4), S. 927–939.
- Battey, A. S.; Schaffner, D. W. (2001): Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Applied Microbiology* 91 (2), S. 237–247.

- Bauchop, T.; Dawes, E. A. (1959): Metabolism of pyruvic and formic acids by *Zymosarcina ventriculi*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 36 (1), S. 294–296.
- Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. (2001): Natural Raw Materials in the Flavor and Fragrance Industry. In: Kurt Bauer: *Common Fragrance and Flavor Materials*. 4. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, S. 167–226.
- Baxa, J. (1937): Die Zuckererzeugung 1600-1850. Jena, Deutschland: Fischer.
- Beck, K.; Wu, L. F.; Brunner, J.; Müller, M. (2000): Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. In: *The EMBO Journal* 19 (1), S. 134–143.
- Belpoggi, F.; Soffritti, M.; Padovani, M.; Degli E., Davide; L., M.; Minardi, F. (2006): Results of long-term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1076, S. 559–577.
- Bentele, K.; Saffert, P.; Rauscher, R.; Ignatova, Z.; Blüthgen, N. (2013): Efficient translation initiation dictates codon usage at gene start. In: *Molecular Systems Biology* 9, S. 675–685.
- Berry, A.; Connie, L.; Mayer, A. F.; Shinjoh, M. (2012): Microbial production of L-ascorbic acid. US 8,338,144 B2.
- Beuzelin-Ollivier, M. G.; Chevreux, B.; Dalluege, M.; Van Gelder, M.; Goese, M. G.; Hauk, C. *et al.* (2012): Fermentative vitamin C production: United States. US 8318462 B2.
- Birdsell, D. C.; Cota-Robles, E. H. (1967): Production and Ultrastructure of Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate-Lysozyme Spheroplasts of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 93 (1), S. 427–437.
- Blackwood, A. C.; Guimberteau, G.; Peynaud, E. (1969): Sur les bactéries acétiques isolées de raisins. In: *Comptes rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles* 269 (7), S. 802–804.
- Blanchard, J. S.; Brewer, C. F.; Englard, S.; Avigad, G. (1982): Solution structure of 5-keto-D-fructose. Relevance to the specificity of hexose kinases. In: *Biochemistry* 21 (1), S. 75–81.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis* 8 (2), S. 93–99.
- Blum, K.; Thanos, P. K.; Gold, M. S. (2014): Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. In: *Frontiers in Psychology* 5, S. 919–930.
- Bonde, M. T.; Pedersen, M.; Klausen, M. S.; Jensen, S. I.; Wulff, T.; Harrison, S. *et al.* (2016): Predictable tuning of protein expression in bacteria. In: *Nature Methods* 13 (3), S. 233–236.
- Bonnot, F.; Iavarone, A. T.; Klinman, J. P. (2013): Multistep, eight-electron oxidation catalyzed by the cofactorless oxidase, PqqC: identification of chemical intermediates and their dependence on molecular oxygen. In: *Biochemistry* 52 (27), S. 4667–4675.

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72, S. 248–254.
- Branca, R. M. M.; Bodó, G.; Várkonyi, Z.; Debreczeny, M.; Osz, J.; Bagyinka, C. (2007): Oxygen and temperature-dependent structural and redox changes in a novel cytochrome *c* (4) from the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 467 (2), S. 174–184.
- Bremus, C.; Herrmann, U.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (2006): The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. In: *Journal of Biotechnology* 124 (1), S. 196–205.
- Brewer, C. F.; Blanchard, J. S.; Englard, S.; Jacob, G.; Avigad, G. (1982): Solid-state <sup>13</sup>C-N.M.R. spectroscopy of D-threo-2,5-hexodiulose (5-keto-D-fructose). In: *Carbohydrate Research* 102 (1), S. 294–297.
- Bringer-Meyer, S.; Schimz, K.-L.; Sahm, H. (1986): Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. In: *Archives of Microbiology* 146 (2), S. 105–110.
- Brundage, L.; Hendrick, J. P.; Schiebel, E.; Driessen, A. J.; Wickner, W. (1990): The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. In: *Cell* 62 (4), S. 649–657.
- Buchan, D. W. A.; Minneci, F.; Nugent, T. C. O.; Bryson, K.; Jones, D. T. (2013): Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. In: *Nucleic Acids Research* 41, 349–357.
- Buchert, J.; Viikari, L. (1988): Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (4), S. 375–379.
- Burroughs, L. F.; Sparks, A. H. (1973): Sulphite-binding power of wines and ciders. III. Determination of carbonyl compounds in a wine and calculation of its sulphite-binding power. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24 (2), S. 207–217.
- Byrd, C.; Turner, G. C.; Varshavsky, A. (1998): The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. In: *The EMBO Journal* 17 (1), S. 269–277.
- Camu, N.; de Winter, T.; Verbrugghe, K.; Cleenwerck, I.; Vandamme, P.; Takrama, J. S. *et al.* (2007): Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (6), S. 1809–1824.
- Chapin, F. S.; Schulze, E.; Mooney, H. A. (1990): The Ecology and Economics of Storage in Plants. In: *Annual Review of Ecology and Systematics* 21 (1), S. 423–447.
- Chatterjee, I. B. (1973): Evolution and the Biosynthesis of Ascorbic Acid. In: *Science* 182 (4118), S. 1271–1272.
- Choi, E. S.; Lee, E. H.; Rhee, S. K. (1995): Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. In: *FEMS Microbiology Letters* 125 (1), S. 45–49.

- Choi, J. H.; Lee, S. Y. (2004): Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (5), S. 625–635.
- Claus, G. W.; Batzing, B. L.; Baker, C. A.; Goebel, E. M. (1975): Intracytoplasmic Membrane Formation and Increased Oxidation of Glycerol During Growth of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Bacteriology* 123 (3), S. 1169–1183.
- Cristóbal, S.; de Gier, J. W.; Nielsen, H.; Von Heijne, G. (1999): Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. In: *The EMBO Journal* 18 (11), S. 2982–2990.
- Czaja, W.; Krystynowicz, A.; Bielecki, S.; Brown, R. M. [JR] (2006): Microbial cellulose – the natural power to heal wounds. In: *Biomaterials* 27 (2), S. 145–151.
- Dakshinamurti, K.; Chauhan, J (1994): Biotin-binding proteins. In: K. Dakshinamurti: *Vitamin receptors. Vitamins as ligands in cell communication*. 1. Aufl. Cambridge: Cambridge Univ. Pr (Intercellular and intracellular communication, 6).
- Davidson, V. L. (2004): Electron transfer in quinoproteins. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428 (1), S. 32–40.
- Dawes, E. A.; Ribbons, D. W.; Large, P. J. (1966): The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. In: *Biochemical Journal* 98 (3), S. 795–803.
- D'Costa, E. J.; Higgins, I. J.; Turner, A.P.F. (1986): Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. In: *Biosensors* 2 (2), S. 71–87.
- de Ley, J.; Gillis, M.; Swings, J. (1984): The genus *Gluconobacter*. In: N. R. Krieg und Holt, J. G.: *Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1*. Baltimore: Williams and Wilkins, S. 267–278.
- de Ley, J.; Schell, J. (1962): Lactate and pyruvate catabolism in acetic acid bacteria. In: *Journal of General Microbiology* 29, S. 589–601.
- De Muynck, C.; Pereira, C. S. S.; Naessens, M.; Parmentier, S.; Soetaert, W.; Vandamme, E. J. (2007): The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (3), S. 147–171.
- De Smit, M. H.; van Duin, J. (1990): Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency. A quantitative analysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (19), S. 7668–7672.
- De Smit, M. H.; van Duin, J. (1994): Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data. In: *Journal of Molecular Biology* 244 (2), S. 144–150.
- Deppenmeier, U.; Ehrenreich, A. (2009): Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1-2), S. 69–80.
- Deppenmeier, U.; Hoffmeister, M.; Prust, C. (2002): Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3), S. 233–242.



- Dias, J. M. L.; Lemos, P. C.; Serafim, L. S.; Oliveira, C.; Eiroa, M.; Albuquerque, M. G. E. *et al.* (2006): Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. In: *Macromolecular bioscience* 6 (11), S. 885–906.
- Dodić, S.; Dodić, J.; Jevtić Mučibabić, R.; Popov, S.; Ranković, J.; Zavargo, Z. (2009): Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. In: *Biomass and Bioenergy* 33 (5), S. 822–827.
- Dong, H.; Nilsson, L.; Kurland, C. G. (1996): Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. In: *Journal of Molecular Biology* 260 (5), S. 649–663.
- Douville, K.; Price, A.; Eichler, J.; Economou, A.; Wickner, W. (1995): SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270 (34), S. 20106–20111.
- Drauz, K.; Waldman, H. (2002): Enzyme catalysis in organic synthesis, Vol I-III. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Driessen, A. J. M. und N. Nouwen (2008): Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. In: *Annual Review of Biochemistry* 77, S. 643–667.
- Du, J.; Bai, W.; Song, H.; Yuan, Y. J. (2013): Combinational expression of sorbose/sorbosone dehydrogenases and cofactor pyrroloquinoline quinone increases 2-keto-L-gulonic acid production in *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus cereus* consortium. In: *Metabolic Engineering* 19, S. 50–56.
- Dubal, S. A.; Tilkari, Y. P.; Momin, S. A.; Borkar, I. V. (2008): Biotechnological routes in flavour industries. In: *Advanced Biotechnology*, S. 20–31.
- Duine, J. A.; Jzn., J.Frank; van Zeeland, J. K. (1979): Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. In: *FEBS Letters* 108 (2), S. 443–446.
- Dym, O.; Eisenberg, D. (2001): Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. In: *Protein Science* 10 (9), S. 1712–1728.
- Englard, S.; Avigad, G. (1965): 5-keto-D-fructose. II. Patterns of formation and of associated dehydrogenase activities in *Gluconobacter cerinus*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240, S. 2297–2310.
- Englard, S.; Avigad, G. (1975): 5-keto-D-fructose reductase from *Gluconobacter cerinus*-1. In: *Methods in Enzymology* 41, S. 127–131.
- Englard, S.; Avigad, G.; Prosky, L. (1965): 5-keto-D-fructose. III. Proof of structure based on stereospecific patterns of enzymatic reduction. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240, S. 2302–2307.
- Englard, S.; Berkower, I.; Avigad, G. (1972): 5-Keto-D-fructose. VII. Phosphorylation by liver fructokinase and the monophosphate ester as an inhibitor of liver aldolase. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 279 (2), S. 229–233.

- Ferri, S.; Kojima, K.; Sode, K. (2011): Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. In: *Journal of Diabetes Science and Technology* 5 (5), S. 1068–1076.
- Fialho, A. M.; Moreira, L. M.; Granja, A. T.; Popescu, A. O.; Hoffmann, K.; Sá-Correia, I. (2008): Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (6), S. 889–900.
- Finn, R. D.; Bateman, A.; Clements, J.; Coggill, P.; Eberhardt, R. Y.; Eddy, S. R. *et al.* (2014): Pfam: the protein families database. In: *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), D222-30.
- Fortuna, J. L. (2012): The obesity epidemic and food addiction. Clinical similarities to drug dependence. In: *Journal of Psychoactive Drugs* 44 (1), S. 56–63.
- Frank, J.; Dijkstra, M.; Duine, J. A.; Balny, C. (1988): Kinetic and spectral studies on the redox forms of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X*. In: *European Journal of Biochemistry* 174 (2), S. 331–338.
- Fuganti, C.; Grasselli, P. (1982): Synthesis of the C 14 chromanyl moiety of natural  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (4), S. 205–206.
- Gao, L.; Hu, Y.; Liu, J.; Du, Gu.; Zhou, J.; Chen, J. (2014): Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol. In: *Metabolic Engineering* 24, S. 30–37.
- Garrard, W. T. (1972): Synthesis, Assembly, and Localization of Periplasmic Cytochrome *c*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 247, S. 5935–5943.
- Geerlof, A.; van Tol, J. B. A.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A. (1994): Enantioselective Conversions of the Racemic C 3 -Alcohol Synthons, Glycidol (2,3-Epoxy-1-propanol), and Solketal (2,2-Dimethyl-4-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolane) by Quinohaemoprotein Alcohol Dehydrogenases and Bacteria Containing Such Enzymes. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58 (6), S. 1028–1036.
- Georgiou, G.; Valax, P. (1996): Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. In: *Current Opinion in Biotechnology* 7 (2), S. 190–197.
- Ghisla, S.; Massey, V.; Lhoste, J. M.; Mayhew, S. G. (1974): Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. In: *Biochemistry* 13 (3), S. 589–597.
- Ghommidh, C.; Navarro, J. M.; Durand, G. (1982): A study of acetic acid production by immobilized *Acetobacter* Cells: Oxygen transfer. In: *Biotechnology and Bioengineering* 24 (3), S. 605–617.
- Ghosh, M.; Anthony, C.; Harlos, K.; Goodwin, M. G.; Blake, C. (1995): The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. In: *Structure* 3 (2), S. 177–187.
- Giaquinta, R. T. (1979): Sucrose Translocation and Storage in the Sugar Beet. In: *Plant Physiology* 63 (5), S. 828–832.

- Goodhew, C. F.; Brown, K. R.; Pettigrew, G. W. (1986): Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 852 (2-3), S. 288–294.
- Goodman, D. B.; Church, G. M.; Kosuri, S. (2013): Causes and effects of N-terminal codon bias in bacterial genes. In: *Science* 342 (6157), S. 475–479.
- Grembecka, M. (2015): Sugar alcohols – their role in the modern world of sweeteners. A review. In: *European Food Research and Technology* 241 (1), S. 1–14.
- Guerlava, P.; Izac, V.; Tholozan, J. L. (1998): Comparison of Different Methods of Cell Lysis and Protein Measurements in *Clostridium perfringens*. Application to the Cell Volume Determination. In: *Current Microbiology* 36 (3), S. 131–135.
- Gullo, M.; Caggia, C.; Vero, L. de; Giudici, P. (2006): Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". In: *International Journal of Food Microbiology* 106 (2), S. 209–212.
- Gupta, A.; Singh, V. A.; Qazi, G. N.; Kumar, A. (2001): *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3 (3), S. 445–456.
- Habe, H.; Fukuoka, T.; Morita, T.; Kitamoto, D.; Yakushi, T.; Matsushita, K.; Sakaki, K. (2010): Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74 (7), S. 1391–1395.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (4), S. 557–580.
- Hanahan, D.; Jessee, J.; Bloom, F. R. (1991): Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In: *Methods in Enzymology* 204, S. 63–113.
- Hancock, R. E.; Nikaido, H. (1978): Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. In: *Journal of Bacteriology* 136 (1).
- Hannig, G.; Makrides, S. C. (1998): Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. In: *Trends in Biotechnology* 16 (2), S. 54–60.
- Hauge, J. G. (1964): Glucose Dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an Enzyme with a Novel Prosthetic Group. In: *Journal of Biological Chemistry* 239, S. 3630–3639.
- Heggeset, T. M. B.; Kucharova, V.; Naerdal, I.; Valla, S.; Sletta, H.; Ellingsen, T. E.; Brautaset, T. (2013): Combinatorial mutagenesis and selection of improved signal sequences and their application for high-level production of translocated heterologous proteins in *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (2), S. 559–568.
- Hockney, R. C. (1994): Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. In: *Trends in Biotechnology* 12 (11), S. 456–463.
- Holmgren, A. (1989): Thioredoxin and glutaredoxin systems. In: *The Journal of Biological Chemistry* 264 (24), S. 13963–13966.

- Hölscher, T.; Görisch, H. (2006): Knockout and Overexpression of Pyrroloquinoline Quinone Biosynthetic Genes in *Gluconobacter oxydans* 621H $\nabla$ . In: *Journal of Bacteriology* 188 (21), S. 7668–7676.
- Hölscher, T.; Weinert-Sepalage, D.; Gorisch, H. (2007): Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. In: *Microbiology* 153 (2), S. 499–506.
- Hoshino, T.; Sugisawa, T.; Fujiwara, A. (1991): Isolation and Characterization of NAD(P)-Dependent L-Sorbose Dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (3), S. 665–670.
- Hunter, S.; Jones, P.; Mitchell, A.; Apweiler, R.; Attwood, T. K.; Bateman, A. *et al.* (2012): InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. In: *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue), D306-12.
- Hyun, H. H.; Zeikus, J. G. (1985): Simultaneous and Enhanced Production of Thermostable Amylases and Ethanol from Starch by Cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 49 (5), S. 1174–1181.
- Ikeda, T.; Matsushita, F.; Senda, M. (2014): D-Fructose Dehydrogenase-modified Carbon Paste Electrode Containing p-Benzoquinone as a Mediated Amperometric Fructose Sensor. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (11), S. 2919–2924.
- Illegheems, K.; De Vuyst, L.; Weckx, S. (2013): Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem. In: *BMC Genomics* 14, S. 526.
- Imada, K.; Sato, K.; Ōga, S.; Asano, K. (1966): The Determination of 5-Keto-D-Fructose. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 30 (11), S. 1173–1174.
- Jing, S.; Ji, Y.; Li, C.; Jiang, M.; Yang, W.; Chen, M.; Xu, H. (2009): Studies on the characteristics of *Gluconobacter melanogenus* with high concentration of D-sorbitol in semi-continuous fermentation. In: *Biotechnology Letters* (19), S. 77–78.
- Jones, D. T. (1999): Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. In: *Journal of Molecular Biology* 292 (2), S. 195–202.
- Takehi, N.; Yamazaki, T.; Tsugawa, W.; Sode, K. (2007): A novel wireless glucose sensor employing direct electron transfer principle based enzyme fuel cell. In: *Biosensors & Bioelectronics* 22 (9-10), S. 2250–2255.
- Kallnik, V.; Meyer, M.; Deppenmeier, U.; Schweiger, P. (2010): Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Biotechnology* 150 (4), S. 460–465.
- Kallnik, V.; Schulz, C.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2011): Properties of recombinant Strep-tagged and untagged hyperthermophilic D-arabitol dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (4), S. 1285–1293.
- Kasahara, T.; Kato, T. (2003): Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. In: *Nature* 422 (6934), S. 832.

- Kawai, S.; Goda-Tsutsumi, M.; Yakushi, To.; Kano, K.; Matsushita, K. (2013): Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome *c* complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5), S. 1654–1660.
- Keltjens, J. T.; Pol, A.; Reimann, J.; Op den Camp, H. J. M. (2014): PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (14), S. 6163–6183.
- Kerstens, K.; de Ley, J. (1968): The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 34 (4), S. 393–408.
- Kerstens, K.; Lisdiyanti, P.; Komagata, K.; Swings, J. (2006): The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Stackebrandt, Erko: *The Prokaryotes*. Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. New York, NY: Springer-Verlag, S. 163–200.
- Killgore, J. (1989): Nutritional Importance of Pyrroloquinoline Quinone. In: *Science* 245 (4920), S. 850–852.
- Kim, H. W.; Wang, J. Y.; Lee, J. Y.; Park, A. K.; Park, H.; Jeon, S. J. (2016): Biochemical and structural characterization of quinoprotein aldose sugar dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HJ6: Mutational analysis of Tyr156 in the substrate-binding site. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 608, S. 20–26.
- Klasen, R.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1995): Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate:NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Bacteriology* 177 (10), S. 2637–2643.
- Kleiger, G.; Eisenberg, D. (2002): GXXXG and GXXXA Motifs Stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann Folds Through Ca–HO Hydrogen Bonds and van der Waals Interactions. In: *Journal of Molecular Biology* 323 (1), S. 69–76.
- Knoblauch, N. T.; Rüdiger, S.; Schönfeld, H. J.; Driessen, A. J.; Schneider-Mergener, J.; Bukau, B. (1999): Substrate specificity of the SecB chaperone. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (48), S. 34219–34225.
- Koch, H. G.; Hengelage, T.; Neumann-Haefelin, C.; MacFarlane, J.; Hoffschulte, H. K.; Schimz, K. L. *et al.* (1999): *In vitro* studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. In: *Molecular Biology of the Cell* 10 (7), S. 2163–2173.
- Kondo, K.; Horinouchi, S. (1997): Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (3).
- Kosciow, K. (2017): Untersuchungen zur Erweiterung des Substratspektrums von *Gluconobacter oxydans*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

- Kosciow, K.; Domin, C.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2016): Extracellular targeting of an active endoxylanase by a TolB negative mutant of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 43 (7), S. 989–999.
- Kosciow, K.; Zahid, N.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Production of a periplasmic trehalase in *Gluconobacter oxydans* and growth on trehalose. In: *Journal of Biotechnology* 189, S. 27–35.
- Kovach, M. E.; Elzer, P. H.; Steven Hill, D.; Robertson, G. T.; Farris, M. A.; Roop, R. M.; Peterson, K. M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. In: *Gene* 166 (1), S. 175–176.
- Koytchev, R.; Vlahov, V.; Bacratcheva, N.; Giesel, B.; Gawronska-Szklarz, B.; Wojcicki, J. *et al.* (2003): Evaluation of the efficacy of a combined formulation (Grippostad-C) in the therapy of symptoms of common cold: a randomized, double-blind, multicenter trial. In: *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 41 (3), S. 114–125.
- Krajewski, V.; Simic, P.; Mouncey, N. J.; Bringer, S.; Sahm, H.; Bott, M. (2010): Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13), S. 4369–4376.
- Kryvoruchko, V.; Machmüller, A.; Bodirosa, V.; Amon, B.; Amon, T. (2009): Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. In: *Biomass and Bioenergy* 33 (4), S. 620–627.
- Kudla, G.; Murray, A. W.; Tollervey, D.; Plotkin, J. B. (2009): Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. In: *Science* 324 (5924), S. 255–258.
- Kulhánek, M. (1990): Microbial Dehydrogenations of Monosaccharides. In: S. L. Neidleman und Laskin, A. I.: *Advances in Applied Microbiology*, Bd. 34. New York: Academic P (Advances in Applied Microbiology), S. 141–182.
- Kundu, A.; Jang, J. H.; Gil, J. H.; Jung, C. R.; Lee, H. R.; Kim, S.-H. *et al.* (2007): Micro-fuel cells – Current development and applications. In: *Journal of Power Sources* 170 (1), S. 67–78.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*.
- Lazzaroni, J. C.; Germon, P.; Ray, M. C.; Vianney, A. (1999): The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. In: *FEMS Microbiology Letters* 177 (2), S. 191–197.
- Li, W.; Cowley, A.; Uludag, M.; Gur, T.; McWilliam, H.; Squizzato, S. *et al.* (2015): The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. In: *Nucleic Acids Research* 43 (W1), 580-584.
- Linden, J. C. (1982): Immobilized  $\alpha$ -D-galactosidase in the sugar beet industry. In: *Enzyme and Microbial Technology* 4 (3), S. 130–136.
- Lippmann, E. O. (1929): *Geschichte des Zuckers*. 2. Aufl. Berlin, Deutschland: Springer.

- Longley, R. P.; Perlman, D. (1972): Conversion of L-sorbose to 5-keto-D-fructose by Pseudomonads. In: *Biotechnology and Bioengineering* 14 (5), S. 843–846.
- Lopitz-Otsoa, F.; Rementeria, A.; Elguezabal, N.; Garaizar, J. (2006): Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. In: *Revista Iberoamericana de Micología* 23, S. 67–74.
- Machado, S. S.; Wandel, U.; Jongejan, J. A.; Straathof, A. J.; Duine, J. A. (1999): Characterization of the Enantioselective Properties of the Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase of *Acetobacter pasteurianus* LMG 1635. 1. Different Enantiomeric Ratios of Whole Cells and Purified Enzyme in the Kinetic Resolution of Racemic Glycidol. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63 (1), S. 10–20.
- Magnusson, O. T.; Toyama, H.; Saeki, M.; Schwarzenbacher, R.; Klinman, J. P. (2004): The structure of a biosynthetic intermediate of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and elucidation of the final step of PQQ biosynthesis. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (17), S. 5342–5343.
- Mandl, J.; Szarka, A.; Bánhegyi, G. (2009): Vitamin C: update on physiology and pharmacology. In: *British journal of pharmacology* 157 (7), S. 1097–1110.
- Marchler-Bauer, A.; Anderson, J. B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.; DeWeese-Scott, C.; Fong, J. H. *et al.* (2009): CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. In: *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue), D205–10.
- Marchler-Bauer, A.; Bryant, S. H. (2004): CD-Search: protein domain annotations on the fly. In: *Nucleic Acids Research* 32, W327–31.
- Marshall, T. A.; Eichenberger-Gilmore, J. M.; Larson, M. A.; Warren, J. J.; Levy, S. M. (2007): Comparison of the intakes of sugars by young children with and without dental caries experience. In: *Journal of the American Dental Association* 138 (1), S. 39–46.
- Martin, N.; Berger, C.; Le Du, C.; Spinnler, H. E. (2001): Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. In: *Journal of Dairy Science* 84 (10), S. 2125–2135.
- Martoglio, B.; Dobberstein, B. (1998): Signal sequences. More than just greasy peptides. In: *Trends in Cell Biology* 8 (10), S. 410–415.
- Massey, V.; Ganther, H. (1965): On the interpretation of the absorption spectra of flavoproteins with special reference to D-amino acid oxidase. In: *Biochemistry* 4 (6), S. 1161–1173.
- Matsumoto, K.; Hamada, O.; Ukeda, H.; Osajima, Y. (2002): Amperometric flow injection determination of fructose with an immobilized fructose 5-dehydrogenase reactor. In: *Analytical Chemistry* 58 (13), S. 2732–2734.
- Matsushita, K.; Fujii, Y.; Ano, Y.; Toyama, H.; Shinjoh, M.; Tomiyama, N. *et al.* (2003): 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4), S. 1959–1966.

- Matsushita, K.; Ohno, Y.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1980): Membrane-bound D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. Solubilization, purification and characterization. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 44 (7), S. 1505–1512.
- Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1982): Membrane-bound cytochromes *c* of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. Purification and characterization of cytochromes *c*-551 and *c*-555. In: *Journal of Biochemistry* 92 (5), S. 1607–1613.
- Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1987): Purification, characterization and reconstitution of cytochrome o-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 894 (2), S. 304–312.
- Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1989): Quinoprotein D-glucose dehydrogenases in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41. Purification and characterization of the membrane-bound enzyme distinct from the soluble enzyme. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 56 (1), S. 63–72.
- Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1990): Cytochrome *a*<sub>1</sub> of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *b*<sub>a</sub> functioning as ubiquinol oxidase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24), S. 9863–9867.
- Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. (1994a): Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. In: A. H. Rose und Tempest, D. W.: *Advances in microbial physiology*, Bd. 36: Academic (Advances in Microbial Physiology), S. 247–301.
- Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. (1994b): Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. In: A. H. Rose und Tempest, D. W.: *Advances in microbial physiology*, Bd. 36: Academic (Advances in Microbial Physiology), S. 247–301.
- Mattes, R. D.; Popkin, B. M. (2009): Nonnutritive sweetener consumption in humans. Effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (1), S. 1–14.
- Mavridou, D. A. I.; Ferguson, S. J.; Stevens, J. M. (2013): Cytochrome *c* assembly. In: *IUBMB Life* 65 (3), S. 209–216.
- McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N. *et al.* (2013): Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. In: *Nucleic Acids Research* 41, W597–600.
- Mergulhão, F. J. M.; Summers, D. K.; Monteiro, G. A. (2005): Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology Advances* 23 (3), S. 177–202.
- Meyer, D.; Schneider-Fresenius, C.; Horlacher, R.; Peist, R.; Boos, W. (1997): Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 179 (4), S. 1298–1306.
- Meyer, M. (2014): Produktion und Aufreinigung von Enzymen aus Essigsäurebakterien für biotechnologische Anwendungen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.



- Meyer, M.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2013): Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (8), S. 3457–3466.
- Mientus, M.; Kostner, D.; Peters, B.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2017): Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (8), S. 3189–3200.
- Miller, T. R.; Delcher, A. L.; Salzberg, S. L.; Saunders, E.; Detter, J. C.; Halden, R. U. (2010): Genome sequence of the dioxin-mineralizing bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. In: *Journal of Bacteriology* 192 (22), S. 6101–6102.
- Misra, H. S.; Rajpurohit, Y. S.; Khairnar, N. P. (2012): Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. In: *Journal of Biosciences* 37 (2), S. 313–325.
- Miura, H.; Mogi, T.; Ano, Y.; Migita, C. T.; Matsutani, M.; Yakushi, T. *et al.* (2013): Cyanide-insensitive quinol oxidase (CIO) from *Gluconobacter oxydans* is a unique terminal oxidase subfamily of cytochrome bd. In: *Journal of Biochemistry* 153 (6), S. 535–545.
- Miyazaki, T.; Sugisawa, T.; Hoshino, T. (2006): Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* catalyze the direct conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid. In: *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2), S. 1487–1495.
- Montonen, J.; Jarvinen, R.; Knekt, P.; Heliövaara, M.; Reunanen, A. (2007): Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. In: *The Journal of Nutrition* 137 (6), S. 1447–1454.
- Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N. (2007): Advances in the enzymatic reduction of ketones. In: *Accounts of Chemical Research* 40 (12), S. 1412–1419.
- Moretti, M.; Colla, A.; De Oliveira Balen, G.; dos Santos, D. B.; Budni, J.; De Freitas, A. E. *et al.* (2012): Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. In: *Journal of Psychiatric Research* 46 (3), S. 331–340.
- Morris, C. J.; Biville, F.; Turlin, E.; Lee, E.; Ellermann, K.; Fan, W. H. *et al.* (1994): Isolation, phenotypic characterization, and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of pqqD, pqqG, and pqqC. In: *Journal of Bacteriology* 176 (6), S. 1746–1755.
- Mowshowitz, S.; Avigad, G.; England, S. (1974): 5-Keto-D-Fructose: Formation and Utilization in the Course of D-Fructose Assimilation by *Gluconobacter cerinus*. In: *Journal of Bacteriology* 118 (3), S. 1051–1058.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*. The polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1, S. 263–273.
- Murata, K.; Nakamura, N.; Ohno, Hi.; Suzuki, M. (2009): Direct evidence of electron flow via the heme *c* group for the direct electron transfer reaction of fructose dehydrogenase using

- a silver nanoparticle-modified electrode. In: *Electrochemistry Communications* 11 (8), S. 1623–1626.
- Olijve, W.; Kok, J. J. (1979a): An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. In: *Archives of Microbiology* 121 (3), S. 291–297.
- Olijve, W.; Kok, J. J. (1979b): Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. In: *Archives of Microbiology* 121 (3), S. 283–290.
- Olney, J. W.; Farber, N. B.; Spitznagel, E.; Robins, L. N. (1996): Increasing brain tumor rates. Is there a link to aspartame? In: *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55 (11), S. 1115–1123.
- Olsthoorn, A. J.; Duine, J. A. (1996): Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 336 (1), S. 42–48.
- O'Mullan, P. J.; Chase, T.; Eveleigh, D. E. (1992): Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (3).
- Opekarová, M.; Tanner, W. (2003): Specific lipid requirements of membrane proteins – a putative bottleneck in heterologous expression. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1610 (1), S. 11–22.
- Oubrie, A.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Huizinga, E. G.; Dijkstra, B. W. (2002): Crystal structure of quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (5), S. 3727–3732.
- Oubrie, A.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Olsthoorn, A. J.; Duine, J. A.; Dijkstra, B. W. (1999): Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. In: *The EMBO Journal* 18 (19), S. 5187–5194.
- Palomo, C.; Oiarbide, M.; García, J. M. (2012):  $\alpha$ -Hydroxy ketones as useful templates in asymmetric reactions. In: *Chemical Society Reviews* 41 (11), S. 4150–4164.
- Panella, Lee (2010): Sugar Beet as an Energy Crop. In: *Sugar Tech* 12 (3-4), S. 288–293.
- Pappenberger, G.; Hohmann, H. P. (2014): Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 143, S. 143–188.
- Parmentier, S.; Beauprez, J.; Arnaut, F.; Soetaert, W.; Vandamme, E. J. (2005): *Gluconobacter oxydans* NAD-dependent, D-fructose reducing, polyol dehydrogenases activity. Screening, medium optimisation and application for enzymatic polyol production. In: *Biotechnology Letters* 27 (5), S. 305–311.
- Peters, B.; Mientus, M.; Kostner, D.; Junker, A.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013): Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (14), S. 6397–6412.

- Pop, C.; Rouskin, S.; Ingolia, N. T.; Han, L.; Phizicky, E. M.; Weissman, J. S.; Koller, D. (2014): Causal signals between codon bias, mRNA structure, and the efficiency of translation and elongation. In: *Molecular Systems Biology* 10, S. 770.
- Power, P. M.; Jones, R. A.; Beacham, I. R.; Bucholtz, C.; Jennings, M. P. (2004): Whole genome analysis reveals a high incidence of non-optimal codons in secretory signal sequences of *Escherichia coli*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (3), S. 1038–1044.
- Pronk, J. T.; Levering, P. R.; Olijve, W.; van Dijken, J. P. (1989): Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. In: *Enzyme and Microbial Technology* 11 (3), S. 160–164.
- Prust, C.; Hoffmeister, M.; Liesegang, H.; Wiezer, A.; Fricke, W. F.; Ehrenreich, A. *et al.* (2005): Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. In: *Nature Biotechnology* 23 (2), S. 195–200.
- Pugsley, A. P. (1993): The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. In: *Microbiological Reviews* 57 (1), S. 50–108.
- Rabenhorst, J.; Gattfield, I.; Hilmer, J. M. (2001): Natural, aliphatic and thiocarboxylic acids obtainable by fermentation and a microorganism therefore. EP1078990.
- Ramos, R. M.; Pacheco, J. G.; Gonçalves, L. M.; Valente, I. M.; Rodrigues, J. A.; Barros, A. A. (2012): Determination of free and total diacetyl in wine by HPLC–UV using gas-diffusion microextraction and pre-column derivatization. In: *Food Control* 24 (1-2), S. 220–224.
- Rath, A.; Glibowicka, M.; Nadeau, V. G.; Chen, G.; Deber, C. M. (2009): Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6), S. 1760–1765.
- Rauch, B.; Pahlke, J.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2010): Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (3), S. 711–718.
- Razmovski, R.; Vučurović, V. (2012): Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. In: *Fuel* 92 (1), S. 1–8.
- Razumiene, J.; Cirbaite, E.; Razumas, V.; Laurinavicius, V. (2015): New mediators for biosensors based on PQQ-dependent alcohol dehydrogenases. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 207, S. 1019–1025.
- Reichstein, T.; Grüssner, A. (1934): Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). In: *Helvetica Chimica Acta* 17 (1), S. 311–328.
- Reinefeld, E.; Bliesener, K. M.; Schulze, J. (1982): Zucker. In: *Zuckerindustrie* 107, 283-291; 1111-1119.
- Richhardt, J.; Bringer, S.; Bott, M. (2012): Mutational analysis of the pentose phosphate and Entner-Doudoroff pathways in *Gluconobacter oxydans* reveals improved growth of a  $\Delta$ edd  $\Delta$ eda mutant on mannitol. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (19), S. 6975–6986.

- Richhardt, J.; Bringer, S.; Bott, M. (2013a): Role of the pentose phosphate pathway and the Entner–Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (10), S. 4315–4323.
- Richhardt, J.; Luchterhand, B.; Bringer, S.; Büchs, J.; Bott, M. (2013b): Evidence for a key role of cytochrome bo<sub>3</sub> oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Bacteriology* 195 (18), S. 4210–4220.
- Rodionov, D. A.; Gelfand, M. S. (2006): Computational identification of BioR, a transcriptional regulator of biotin metabolism in Alphaproteobacteria, and of its binding signal. In: *FEMS Microbiology Letters* 255 (1), S. 102–107.
- Rollini, M.; Manzoni, M. (2005): Bioconversion of D-galactitol to tagatose and dehydrogenase activity induction in *Gluconobacter oxydans*. In: *Process Biochemistry* 40 (1), S. 437–444.
- Romano, D.; Villa, R.; Molinari, F. (2012): Preparative biotransformations. Oxidation of alcohols. In: *ChemCatChem* 4 (6), S. 739–749.
- Rona, C.; Vailati, F.; Berardesca, E. (2004): The cosmetic treatment of wrinkles. In: *Journal of cosmetic dermatology* 3 (1), S. 26–34.
- Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. (2014): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. In: *Frontiers in Microbiology* 5, S. 172.
- Saito, Y.; Ishii, Y.; Hayashi, H.; Imao, Y.; Akashi, T.; Yoshikawa, K. *et al.* (1997): Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (2), S. 454–460.
- Sato, K.; Yamada, Y.; Aida, K.; Uemura, T. (1969): Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol. In: *Journal of Biochemistry* 66 (4), S. 521–527.
- Sauer, M.; Mattanovich, D.; Marx, H. (2013): Microbial production of organic acids for use in food. In: B. McNeil, D. B. Archer und Giavasis, Ioannis: *Microbial production of food ingredients, enzymes, and nutraceuticals*. Oxford: Woodhead Publishing Limited (246).
- Schedel, M. (2001): Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, key reaction in the industrial 1-deoxynojirimycin synthesis. In: G. Reed und Rehm, H. J.: *Biotechnology*. Set. 2. Aufl. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH, S. 295–311.
- Schiweck, H. (1983): Zucker, Rüben- und Rohr. In: *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Bd. 24*. 4. Aufl. Weinheim, Germany: Chemie: Weinheim (24), S. 703–748.
- Schmid, Rolf D.; Urlacher, Vlada B. (2007): Modern biooxidation: Enzymes, reactions and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Schnaitman, C. A. (1970): Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 104 (2), S. 890–901.

- Schrader, J.; Etschmann, M.M.W.; Sell, D.; Hilmer, J. M.; Rabenhorst, J. (2004): Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. In: *Biotechnology Letters* 26 (6), S. 463–472.
- Schrimsher, J. L.; Wingfield, P. T.; Bernard, A.; Mattaliano, R.; Payton, M. A. (1988): Purification and characterization of 5-ketofructose reductase from *Erwinia citreus*. In: *Biochemical Journal* 253 (2), S. 511–516.
- Schweiger, P.; Gross, H.; Wesener, S.; Deppenmeier, U. (2008): Vinyl ketone reduction by three distinct *Gluconobacter oxydans* 621H enzymes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (6), S. 995–1006.
- Schweiger, P.; Gross, H.; Zeiser, J.; Deppenmeier, U. (2013): Asymmetric reduction of diketones by two *Gluconobacter oxydans* oxidoreductases. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (8), S. 3475–3484.
- Schweiger, P.; Volland, S.; Deppenmeier, U. (2007): Overproduction and characterization of two distinct aldehyde-oxidizing enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13 (1-3), S. 147–155.
- Scopes, R. K.; Testolin, V.; Stoter, A.; Griffiths-Smith, K.; Algar, E. M. (1985): Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. In: *Biochemical Journal* 228 (3), S. 627–634.
- Seiskari, P.; Linko, Y. Y.; Linko, P. (1985): Continuous production of gluconic acid by immobilized *Gluconobacter oxydans* cell bioreactor. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 21 (6), S. 356–360.
- Seo, S. W.; Yang, J. S.; Kim, In.; Yang, J.; Min, B. E.; Kim, S.; Jung, G. Y. (2013): Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. In: *Metabolic Engineering* 15, S. 67–74.
- Shapiro, S. S.; Saliou, C. (2001): Role of vitamins in skin care. In: *Nutrition* 17 (10), S. 839–844.
- Shimao, M.; Ninomiya, K.; Kuno, O.; Kato, N.; Sakazawa, C. (1986): Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. In: *Applied and Environmental Microbiology* 51 (2), S. 268–275.
- Shinagawa, E.; Ano, Y.; Yakushi, T.; Adachi, O.; Matsushita, K. (2009): Solubilization, purification, and properties of membrane-bound D-glucono-delta-lactone hydrolase from *Gluconobacter oxydans*. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73 (1), S. 241–244.
- Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1982): Purification and characterization of d-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var.  $\alpha$ . In: *Agricultural and Biological Chemistry* 46 (1), S. 135–141.
- Shine, J.; Dalgarno, L. (1975): Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA. Correlation between the 3'-terminal-polypyrimidine sequence of 16-S RNA and translational specificity of the ribosome. In: *European Journal of Biochemistry* 57 (1), S. 221–230.

- Shinjoh, M.; Tomiyama, N.; Asakura, A.; Hoshino, T. (1995): Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound L-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 61 (2), S. 413–420.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W. *et al.* (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular Systems Biology* 7, S. 539.
- Sievers, M.; Swings, J. (2005): Family II. Acetobacteraceae. In: Don J. Brenner: *The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2. ed., S. 41–93.
- Sletta, H.; Tøndervik, A.; Hakvåg, S.; Aune, T. E. V.; Nedal, A.; Aune, R. *et al.* (2007): The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3), S. 906–912.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. *et al.* (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1), S. 76–85.
- Smolander, M.; Buchert, J.; Viikari, L. (1993): Large-scale applicable purification and characterization of a membrane-bound PQQ-dependent aldose dehydrogenase. In: *Journal of Biotechnology* 29 (3), S. 287–297.
- Smolander, M.; Livio, H.-L.; Räsänen, L. (1992): Mediated amperometric determination of xylose and glucose with an immobilized aldose dehydrogenase electrode. In: *Biosensors and Bioelectronics* 7 (9), S. 637–643.
- Soffritti, M.; Belpoggi, F.; Degli Esposti, D.; Lambertini, L.; Tibaldi, E.; Rigano, A. (2006): First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. In: *Environmental Health Perspectives* 114 (3), S. 379–385.
- Somers, W. A. C.; Stigter, E. C. A.; van Hartingsveldt, W.; van der Lugt, J. P. (1998): Enantioselective oxidation of secondary alcohols at a quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase electrode. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 75, S. 151–162.
- Sonoyama, T.; Tani, H.; Matsuda, K.; Kageyama, B.; Tanimoto, M.; Kobayashi, K. *et al.* (1982): Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 43 (5), S. 1064–1069.
- Sørensen, H. P.; Mortensen, K. K. (2005): Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biotechnology* 115 (2), S. 113–128.
- Southall, S. M.; Doel, J. J.; Richardson, D. J.; Oubrie, A. (2006): Soluble aldose sugar dehydrogenase from *Escherichia coli*: a highly exposed active site conferring broad substrate specificity. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (41), S. 30650–30659.
- Stanhope, K. L. (2016): Sugar consumption, metabolic disease and obesity. The state of the controversy. In: *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 53 (1), S. 52–67.

- Stanhope, K. L.; Havel, P. J. (2009): Fructose consumption. Considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. In: *The Journal of Nutrition* 139 (6), 1236–1241.
- Stanhope, K. L.; Schwarz, J. M.; Keim, N. L.; Griffen, S. C.; Bremer, A. A.; Graham, J. L. *et al.* (2009): Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. In: *The Journal of Clinical Investigation* 119 (5), S. 1322–1334.
- Stewart, E. J.; Aslund, F.; Beckwith, J. (1998): Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm. An *in vivo* role reversal for the thioredoxins. In: *The EMBO Journal* 17 (19), S. 5543–5550.
- Suez, J.; Korem, T.; Zeevi, D.; Zilberman-Schapira, G.; Thaiss, C. A.; Maza, O. *et al.* (2014): Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. In: *Nature* 514 (7521), S. 181–186.
- Suez, J.; Korem, T.; Zilberman-Schapira, G.; Segal, E.; Elinav, E. (2015): Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome. Findings and challenges. In: *Gut Microbes* 6 (2), S. 149–155.
- Sugisawa, T.; Hoshino, T.; Masuda, S.; Nomura, S.; Setoguchi, Y.; Tazoe, M. *et al.* (1990): Microbial production of 2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose and D-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (5), S. 1201–1209.
- Sugiyama, M.; Suzuki, S.; Tonouchi, N.; Yokozeki, K. (2003): Cloning of the xylitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* and improved production of xylitol from D-arabitol. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67 (3), S. 584–591.
- Svirbely, J. L.; Szent-Györgyi, A. (1932): The chemical nature of vitamin C. In: *Biochemical Journal* 26 (3), S. 865–870.
- Swings, J.; de Ley, J. (1977): The biology of *Zymomonas*. In: *Bacteriological Reviews* 41 (1), S. 1–46.
- Talabardon, M.; Schwitzguébel, J. P.; Péringer, P.; Yang, S. T. (2000): Acetic acid production from lactose by an anaerobic thermophilic coculture immobilized in a fibrous-bed bioreactor. In: *Biotechnology Progress* 16 (6), S. 1008–1017.
- Tayama, K.; Fukaya, M.; Okumura, H.; Kawamura, Y.; Beppu, T. (1989): Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 32 (2), S. 181–185.
- Terada, O.; Suzuki, S.; Kinoshita, S. (1961): Occurrence of 5-ketofructose during kojic acid formation from sorbose by *Acetobacter* species. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 25 (11), S. 871–872.
- Terpe, K. (2006): Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2), S. 211–222.

Tesfaye, W.; Morales, M.L; García-Parrilla, M.C; Troncoso, A.M (2002): Wine vinegar. Technology, authenticity and quality evaluation. In: *Trends in Food Science & Technology* 13 (1), S. 12–21.

The Family Acetobacteraceae. The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia (2005). 2. Aufl. Luxemburg: Springer Science & Business Media.

Thomas, J. D.; Daniel, R. A.; Errington, J.; Robinson, C. (2001): Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 39 (1), S. 47–53.

Thomas, P. E.; Ryan, D.; Levin, W. (1976): An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. In: *Analytical Biochemistry* 75 (1), S. 168–176.

Tommassen, J.; Leunissen, J.; van Damme-Jongsten, M.; Overduin, P. (1985): Failure of *E. coli* K-12 to transport PhoE-LacZ hybrid proteins out of the cytoplasm. In: *The EMBO Journal* 4 (4), S. 1041–1047.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.

Trivedi, U. B.; Lakshminarayana, D.; Kothari, I. L.; Patel, P. B.; Panchal, C. J. (2009): Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 136 (1), S. 45–51.

Tsukada, Y.; Perlman, D. (1972): The fermentation of L-sorbose by *Gluconobacter melanogenus*. I. General characteristics of the fermentation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 14 (5), S. 799–810.

Tuller, T.; Carmi, A.; Vestsigian, K.; Navon, S.; Dorfan, Y.; Zaborske, J. *et al.* (2010): An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. In: *Cell* 141 (2), S. 344–354.

Umezawa, K.; Takeda, K.; Ishida, T.; Sunagawa, N.; Makabe, A.; Isobe, K. *et al.* (2015): A novel pyrroloquinoline quinone-dependent 2-keto-D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas aureofaciens*. In: *Journal of Bacteriology* 197 (8), S. 1322–1329.

Van Dalen, A.; Killian, A.; de Kruijff, B.; (Keine Angabe) (1999): Delta psi stimulates membrane translocation of the C-terminal part of a signal sequence. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (28), S. 19913–19918.

Van der Berg; Ellis, R. J.; Dobson, C. M. (1999): Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. In: *The EMBO Journal* 18 (24), S. 6927–6933.

Van der Sluis, E. O.; Driessen, A. J. M. (2006): Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria. In: *Trends in Microbiology* 14 (3), S. 105–108.

Vandamme, E. J.; Revuelta, J. L. (2016): Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.



- Vandamme, E. J.; Soetaert, W. (2002): Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77 (12), S. 1323–1332.
- Varshavsky, A. (1996): The N-end rule. Functions, mysteries, uses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (22), S. 12142–12149.
- Vartanian, L. R.; Schwartz, M. B.; Brownell, K. D. (2007): Effects of soft drink consumption on nutrition and health. A systematic review and meta-analysis. In: *American Journal of Public Health* 97 (4), S. 667–675.
- Vastenavoond, C. M.; Bertelsen, H.; Hansen, S. J.; Laursen, R. S.; Saunders, J; Eriknauer, K. (2012): Tagatose (D-Tagatose). In: L. O. B. Nabors: *Alternative sweeteners*. 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, S. 198–215.
- Von Heijne, G. (1990): The signal peptide. In: *The Journal of Membrane Biology* 115 (3), S. 195–201.
- Voss, J.; Ehrenreich, A.; Liebl, W. (2010): Characterization and inactivation of the membrane-bound polyol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 7145 reveals a role in meso-erythritol oxidation. In: *Microbiology* 156 (6), S. 1890–1899.
- Wang, G. J.; Volkow, N. D.; Thanos, P. K.; Fowler, J. S. (2009): Imaging of brain dopamine pathways. Implications for understanding obesity. In: *Journal of Addiction Medicine* 3 (1), S. 8–18.
- Wang, Joseph (2008): Electrochemical glucose biosensors. In: *Chemical reviews* 108 (2), S. 814–825.
- Wang, Y.; Geer, L. Y.; Chappey, C.; Kans, J. A.; Bryant, S. H. (2000): Cn3D: sequence and structure views for Entrez. In: *Trends in Biochemical Science* 25 (6), S. 300–302.
- Weidenhagen, R.; Bernsee, G. (1960): Über ein bakterielles Dehydrierungsprodukt der Fructose (6-aldo-D-Fructose). In: *Chemische Berichte* 93 (12), S. 2924–2928.
- Weihrauch, M. R.; Diehl, V. (2004): Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk? In: *Annals of Oncology* 15 (10), S. 1460–1465.
- Welsh, J. A.; Sharma, A.; Abramson, J. L.; Vaccarino, V.; Gillespie, C.; Vos, M. B. (2010): Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. In: *Journal of the American Medical Association* 303 (15), S. 1490–1497.
- White, S. A.; Claus, G. W. (1982): Effect of intracytoplasmic membrane development on oxidation of sorbitol and other polyols by *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Bacteriology* 150 (2), S. 934–943.
- Whitfield, C.; Trent, M. S. (2014): Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. In: *Annual Review of Biochemistry* 83, S. 99–128.
- Williams, P. J.; Rainbow, C. (1964): Enzymes of the tricarboxylic acid cycle in acetic acid bacteria. In: *Journal of General Microbiology* 35, S. 237–247.
- Wood, P. M. (1978): Periplasmic location of the terminal reductase in nitrite respiration. In: *FEBS Letters* 92 (2), S. 214–218.

- Wyrobnik, D. H.; Wyrobnik, I. H.; Silcoff, E. R. (2012): Agent for use in the case of fructose intolerance: ZA. ZA200805143 (B).
- Wyse, R. (1979): Sucrose uptake by sugar beet tap root tissue. In: *Plant Physiology* 64 (5), S. 837–841.
- Xu, S.; Wang, X.; Du, G.; Zhou, J.; Chen, J. (2014): Enhanced production of L-sorbose from D-sorbitol by improving the mRNA abundance of sorbitol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. In: *Microbial Cell Factories* 13, S. 146–153.
- Xue, Q.; Wei, Z.; Sun, W.; Cui, F.; Yu, S.; Zhou, Q.; Liu, J. (2015): 2-Keto-D-gluconate-yielding membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis* C224: purification and characterization. In: *Molecules* 20 (1), S. 846–862.
- Yakushi, T.; Matsushita, K. (2010): Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (5), S. 1257–1265.
- Yamada, M.; Elias, M. D.; Matsushita, K.; Migita, C. T.; Adachi, O. (2003): *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase. Its structure comparison with other quinoproteins. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* 1647 (1–2), S. 185–192.
- Yamada, Y.; Aida, K.; Uemura, T. (1966): A new enzyme, D-fructose dehydrogenase. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 30 (1), S. 95–96.
- Yin, G.; Tao, Z.; Zhao, Q.; Yu, L.; Yan, Z.; Ning, W. *et al.* (1980): Studies on the production of vitamin C precursor -2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose by fermentation. I. Isolation screening and identification of 2-keto-L-gulonic acid producing bacteria. In: *Acta Microbiologica Sinica* (20), S. 246–251.
- Yoo, E. H.; Lee, S. Y. (2010): Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. In: *Sensors* 10 (5), S. 4558–4576.
- Zafar, M. N.; Beden, N.; Leech, D.; Sygmund, C.; Ludwig, R.; Lo Gorton (2012): Characterization of different FAD-dependent glucose dehydrogenases for possible use in glucose-based biosensors and biofuel cells. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (6), S. 2069–2077.
- Zahid, N.; Schweiger, P.; Galinski, E.; Deppenmeier, U. (2015): Identification of mannitol as compatible solute in *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (13), S. 5511–5521.
- Zalucki, Y. M.; Power, P. M.; Jennings, M. P. (2007): Selection for efficient translation initiation biases codon usage at second amino acid position in secretory proteins. In: *Nucleic Acids Research* 35 (17), S. 5748–5754.
- Zeiser, J. (2015): Charakterisierung von PQQ-abhängigen Dehydrogenasen aus *Sphingomonas wittichii* RW1 und Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens für die Quantifizierung von PQQ. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Zeiser, J.; Mühlenbeck, L. H.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5), S. 2067–2079.

Zhao, L.; Abedpour, N.; Blum, C.; Kolkhof, P.; Beller, M.; Kollmann, M.; Capriotti, E. (2016): Predicting gene expression level in *E. coli* from mRNA sequence information. In: *Biorxiv*.

Zhu, Y. J.; Komor, E.; Moore, P. H. (1997): Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. In: *Plant Physiology* 115 (2), S. 609–616.

Zou, W.; Liu, L.; Chen, J. (2013): Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. In: *Critical Reviews in Microbiology* 39 (3), S. 247–255.

## 7) Anhang

**Anhang 1:** Substanzen verschiedener Klassen, die als Substrate in Enzymaktivitätstests und in Aktivitätstests mit Membranen eingesetzt wurden.

Amino-säuren	Alkohole	Zucker	Ketone	Aldehyde	Diole	Sonstige
D-Serin	Methanol	Xylose	2,3-Butandion	p-Tolu-Aldehyd	Ethylenglycol	DL-Lactat
L-Serin	Ethanol	Fruktose	3-Butan-2-on	Formaldehyd	1,2-Butandiol	Shikimate
L-Lysin	1-Butanol	D-Lyxose	5-Hexen-2-on	Hydrocinnam-Aldehyd	1,3-Butandiol	a-Ketoglukonat
Glycin	2-Propanol	L-Sorbose	Dihydroxyaceton	Undodecyl-Aldehyd	2,4-Pentadiol	Acetoin
L-Valin	2-Butanol	Ribose	2-Hexanone	Glycerol	1,2-Hexandiol	Sorboson
D-Threonin	2-Hexanol	Galaktose	Cyclo-pentenon	m-Tolu-Aldehyd	1,6-Hexandiol	myo-Inositol
L-Threonin	2-Propanol	Glukose	D-Arabinon	Glukol-Aldehyd	1,4-Butandiol	Pyruvat
L-Alanin	3-Pentanol	Ribulose		Cinnam-Aldehyd	2,3 Butandiol	Acetat
L-Cystein	3-Hexanol	Allose	1-Phenyl-1,2-propandion	Heptyl-Aldehyd	1,2-Propandiol	
L-Thyrosin	Thfa	Fucose		Acet-Aldehyd	2-Methyl-1,3-propandiol	
	1-Octanol	Tagatose		2-Methyl-Pentanal	2 Phenyl-1,2-propandiol	
	1-Hexanol			Benzaldehyd	1,3-Propandiol	
	1-Heptanol			Phenyl-Acetaldehyd	1,2-Pentandiol	
	Glycerol			Butanal	1,5-Pentandiol	
	Pva			DL-Glycer-Aldehyd	1,3-Cyclohexandiol	
	1-Propanol			Hexanal	1,4-Cyclohexandiol	
	1-Dodecanol			Propion-Aldehyd	cis-1,2-Cyclopentoldiol	
				Formaldehyd	cis-1,2-Cyclopentandiol	
				2-Methyl-Benzaldehyd	cis-1,3-Cyclohexandiol	
				Isovaler-Aldehyd		
				o-Tolu-Aldehyd		
				2-Methyl-Valeraldehyd		
				Dodecyl-Aldehyd		
				Methylglyoxal		
				DL-Glycer-Aldehyd		
				Valeraldehyd		
				Nonyl-Aldehyd		
				3-Pentanal		

**Anhang 2:** Substratpakete, die bei Versuchen zur Substratumsetzung durch ganze Zellen eingesetzt wurden.

<b>prim. Alkohole</b>	<b>sek. Alkohole</b>	<b>tert. Alkohole</b>	<b>Zucker 1</b>	<b>Zucker 2</b>	<b>Zucker 3</b>
Ethanol	2-Propanol	3-Pentanol	Glukose	Fruktose	Galaktose
1-Butanol	2-Butanol	3-Hexanol	Allose	D-Lyxose	Ribulose
1-Octanol	2-Hexanol		Fucose	Laktose	Tagatose
1-Hexanol	2-Propanol		Xylose	Talose	
1-Propanol			Ribose		

<b>Diole 2</b>	<b>Diole 3</b>	<b>Diole 4</b>	<b>Aldehyde 1</b>	<b>Aldehyde 2</b>	<b>Aldehyde 3</b>
Ethylenglycol	2,4-Pentadiol	1,3-Cyclohexandiol	p-Tolu-Aldehyd	m-Tolu-Aldehyd	Phenyl-Acetaldehyd
1,2-Hexandiol	2,3 Butandiol	1,4-Cyclohexandiol	Formaldehyd	Glukol-Aldehyd	Butanal
1,6-Hexandiol	2-Methyl-1,3-propandiol	cis-1,2-Cyclopentoldiol	Hydrocinnam-Aldehyd	Cinnam-Aldehyd	DL-Glycer-Aldehyd
1,4-Butandiol	2 Phenyl-1,2-propandiol	cis-1,2-Cyclopentandiol	Undodecyl-Aldehyd	Heptyl-Aldehyd	Hexanal
1,2-Propandiol		cis-1,3-Cyclohexandiol	Nonyl-Aldehyd	Acet-Aldehyd	Propion-Aldehyd
1,3-Propandiol			Valeraldehyd	Benzaldehyd	
1,5-Pentandiol					

<b>Aldehyde 4</b>	<b>Aminosäuren 1</b>	<b>Aminosäuren 2</b>	<b>Aminosäuren 3</b>	<b>Aminosäuren 4</b>
2-Methyl-Pentanal	L-Alanin	D-Threonin	L-Valin	L-Serin
2-Methyl-Pentanal	L-Cystein	D-Serin	L-Threonin	L-Lysin
2-Methyl-Benzaldehyd	L-Thyrosin	Methionin	Glutaminsäure	Glycin
2-Methyl-Valeraldehyd		Histidin		Arginin
3-Pentanal				

**Anhang 3:** Substrate, die in Aktivitätstests zur Ermittlung des Substratspektrums der Ketofruktose-Reduktase eingesetzt wurden.

<b>Ketoverbindungen</b>	<b>Zucker</b>	<b>Zuckerderivate</b>	<b>Ketone</b>	<b>Aldehyde</b>
5-Ketofruktos	D- Fruktose	D-Glucosamin	Aceton	DL-Glyceraldehyd
5-ketoglucknat	Saccharose	D-Gluconic g- lacton	2,5-Heptanedion	Zimtaldehyd
2-Ketoglukonat	D-Mannose	Glukonat	Carvon	Benzaldehyd
2-Ketoglukonat	D- Glukose	L-Sorboson	5-Hexan-2-on	Butanal
	Maltose		3-Buten-2on	Acetaldehyd
	L-Talose		Acetylaceton	Glyoxal
	L-Sorbose		3,5-Heptanedion	Methylglyoxal
	L-Arabinose		2-Acetyl-cyclo-pentanon	
	D-Arabinose		4-Hexan-3-on	
	D-Gulose		3-Hydroxy-2-butanon	
	D-Talose		Dihydroxyaceton	
	D-Tagatose		2,3-Pentanedion	
	2-Desoxy-D-Glucose			
	L-Lyxose			
	D-Lyxose			
	D-Xylose			
	D-Allose			
	D-Ribulose			
	D-Xylobiose			
	D-Fucose			
	Melibiose			
	D-Trehalose			
	L-Altrose			
	D-Galaktose			
	L-Rhamnose			
	D-Ribose			
	D-Rafinose			

## 8) Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Deppenmeier für die Bereitstellung des Themas und der Promotionsstelle, sowie für die Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit im Labor und bei der Anfertigung der Dissertation bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau PD Ch. Dahl für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters und für die Begleitung und Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit; einen positiveren Einstieg in die Fachwelt der Mikrobiologie hätte ich nicht haben können.

Ich möchte mich zudem bei Herrn Prof. Dr. E. Galinski und Frau Dr. E. Witt bedanken für die Einblicke in die Welt der NMR-Spektroskopie und die Hilfe bei der Auswertung der Spektren, sowie Herrn Dr. Kehraus für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Dr. P. Kasten vom Rübenbauer-Verband e.V. möchte ich für die freundliche und großzügige Bereitstellung von Zuckerrüben danken.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Sarah Refai für die wunderbare Betreuung während meiner Schreibzeit und die Zeit, Mühe und Unterstützung, die du investiert, auf dich genommen und mir gegeben hast.

Des Weiteren danke ich von Herzen meiner Arbeitsgruppe, Konrad Kosciow, Lena Kröniger, Thomas Franke, Sarah Refai, Elisabeth Schwab, Maria Meyer, Stefanie Berger und Jessi Zeiser, die nicht nur Kollegen, sondern vor allem Freunde, Motivatoren, Hobbists, Zuhörer, Abenteurer und „Leidensgenossen“ waren. Ich hatte eine so schöne Zeit mit euch und das nicht nur im Labor und ihr habt mir viel Kraft und Durchhaltevermögen gegeben; Danke dafür!

Und zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden ein riesiges Dankeschön aussprechen, die mich vorbehaltlos unterstützt haben und in den etwas schwereren Zeiten stets an meiner Seite waren.