

**Etablierung und Optimierung eines  
Produktionssystems zur Synthese des  
alternativen Süßstoffs 5-Ketofruktose in  
*Gluconobacter*-Stämmen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Juliane J. Hoffmann**

aus Köln

Bonn 2021

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

2. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 11.05.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Hoffmann, J. J.; Hövels, M.; Kosciow, K.; Deppenmeier, U. (2020):** Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *Journal of Biotechnology* 307, S. 164-174. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.11.001

**Schiessl, J.; Kosciow, K.; Garschagen, L. S.; Hoffmann, J. J.; Heymuth, J.; Franke, T.; Deppenmeier, U. (2021):** Degradation of the low-calorie sugar substitute 5-ketofructose by different bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (6), S. 2441-2453. DOI: 10.1007/s00253-021-11168-3

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Folgen zuckerreicher Ernährung und Relevanz alternativer Süßstoffe .....	1
1.2 Eigenschaften von 5-Ketofruktose als potentiell Süßungsmittel .....	2
1.3 Methoden zur Produktion von 5-KF .....	3
1.4 Biotechnologische Relevanz der Gattung <i>Gluconobacter</i> .....	5
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	6
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Programme .....	8
2.1.1 Antibiotika und Medienzusätze.....	8
2.1.2 DNA-Polymerasen und Enzyme.....	8
2.1.3 DNA- und Protein-Marker .....	9
2.1.4 Software und Internetprogramme.....	9
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	10
2.2.1 Organismen .....	10
2.2.2 Stammerhaltung .....	11
2.2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen .....	11
2.2.3.1 Kultivierung von <i>Gluconobacter</i> -Stämmen.....	11
2.2.3.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.2.4 Bestimmung des Wachstums und Berechnung der zugehörigen Parameter.....	12
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	12
2.3.1 Plasmide und Oligonukleotide.....	12
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	16
2.3.2.1 Amplifizierung von Genen.....	17
2.3.2.2 Kolonie-PCR .....	18
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.3.4 Isolierung von DNA und Plasmiden.....	19
2.3.5 Restriktionsverdau und Ligation .....	19
2.3.6 Hitzeschock-Transformation in kompetente <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen.....	20
2.3.7 Elektroporation zur Transformation in <i>Gluconobacter</i> -Stämme.....	21
2.3.8 Markerlose Deletion von <i>Img0644</i> .....	21
2.3.8.1 Erstellen von Deletionskonstrukten mittels Assemblierung am Beispiel von pKOS6b $\Delta$ <i>Img0644</i> .....	21
2.3.8.2 Vorgang der markerlosen Deletion über homologe Rekombination .....	22
2.3.9 Erstellen von Integrationsstämmen .....	23
2.3.9.1 Generierung des Stammes <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> .....	23

2.3.9.2 Erstellen des Doppelintegrationsstammes <i>G. oxydans</i> $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ ....	24
2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	24
2.4.1 Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins Inv1417 .....	24
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976).....	25
2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.4.4 Nachweis von Inv1417 mittels Westernblot .....	28
2.5 Nachweis von Enzymaktivitäten.....	29
2.5.1 Zellfraktionierung zur Lokalisation der heterolog produzierten Invertase .....	29
2.5.2 Enzymatische Reinheitskontrolle nach Zellfraktionierung.....	30
2.5.3 Substratspektrum von Inv1417.....	30
2.5.4 Charakterisierung von Inv1417 .....	31
2.5.4.1 Ermittlung des pH- und Temperatur-Optimums .....	31
2.5.4.2 Bestimmung der kinetischen Parameter $K_M$ und $V_{max}$ .....	31
2.5.5 Bestimmung der Fruktose-Dehydrogenase Aktivität.....	32
2.6 Versuche zur 5-KF-Produktion .....	33
2.6.1 Produktion von 5-KF ausgehend von Fruktose.....	33
2.6.2 Einsatz hoher Fruktosemengen zur Steigerung der 5-KF-Ausbeute .....	33
2.6.3 Synthese von 5-KF aus dem Substrat Saccharose .....	34
2.7 Analytischer Nachweis von Substratverwertung und Produktbildung mittels HPLC .....	34
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Optimierung der Saccharosespaltung.....	36
3.1.1 Optimierung der hydrolytischen Aktivität von SacC durch Austausch der Signalpeptide .....	37
3.1.1.1 Auswirkung verschiedener Signalpeptide auf die Effizienz von SacC in <i>G. oxydans</i> $\Delta tolB$ .....	38
3.1.1.2 Auswirkung verschiedener Signalpeptide auf die Effizienz von SacC in <i>G. oxydans</i> .....	39
3.1.1.3 Optimierung der periplasmatischen Saccharosespaltung durch SacC ohne zusätzlich eingefügte Signalsequenz .....	40
3.1.2 Identifizierung eines Saccharose-spaltenden Enzyms in <i>Gluconobacter</i> -Stämmen ....	43
3.2 Charakterisierung der Invertase1417.....	44
3.2.1 Bioinformatische Analysen zu den Saccharose-spaltenden Enzymen.....	44
3.2.2 Klonierung, Überproduktion und Aufreinigung von Inv1417 .....	46
3.2.3 Substratspektrum von Inv1417.....	47
3.2.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von Inv1417 .....	48
3.2.5 Heterologe Produktion von Inv1417 in <i>G. oxydans</i> .....	50
3.3 Festlegung der Pufferbedingungen für die Kultivierung von <i>G. oxydans inv</i> im 5-KF-Produktionsprozess .....	52

3.4 Generierung eines industriell einsetzbaren Ein-Stamm-Systems zur Produktion von 5-KF aus Saccharose .....	53
3.4.1 Plasmid-vermittelte Co-Produktion von FDH und Inv1417 .....	53
3.4.2 Identifizierung von <i>Gluconobacter</i> Wildtyp-Stämmen mit FDH-Aktivität.....	58
3.4.3 Produktion von 5-KF durch <i>G. japonicus</i> LMG 26773 und <i>G. japonicus</i> LMG 1281 ....	60
3.4.3.1 <i>G. japonicus</i> LMG 26773 als natürlicher 5-KF-Produzent ausgehend von Saccharose .....	60
3.4.3.2 Produktion von 5-KF aus Saccharose durch <i>G. japonicus</i> LMG 26773 <i>fdh</i> .....	62
3.4.3.3 Optimierung der 5-KF-Produktion in <i>G. japonicus</i> LMG 26773 durch Gendeletion reduzierender Enzyme.....	64
3.4.3.4 <i>G. japonicus</i> LMG 1281 <i>inv</i> als potentieller 5-KF-Produzent.....	70
3.4.4 Abbau von 5-KF in potentiellen Produktionsstämmen .....	72
3.4.5 Genomintegration als alternativer Weg zur Generierung eines Ein-Stamm-Systems..	73
3.4.5.1 Integration des <i>fdhSCL</i> -Genclusters ins Genom von <i>G. oxydans</i> .....	73
3.4.5.2 FDH-Aktivität verschiedener <i>Gluconobacter</i> -Stämme im Vergleich .....	76
3.4.5.3 Antibiotikafreie 5-KF-Produktion durch <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> .....	77
3.4.6 Generierung eines Ein-Stamm-Systems durch Integration der Invertase1417 .....	78
3.4.6.1 Zellfraktionierung zur Überprüfung der Translokalisierung der heterolog produzierten Invertase1417 .....	79
3.4.6.2 Synthese von 5-KF aus Saccharose mit <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh inv</i> .....	80
3.5 Optimierung der Produktionszeit durch Erstellen einer Doppelintegrationsmutante.....	82
3.5.1 Vergleich der FDH-Aktivität von <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> $\Delta$ <i>sgdh::fdh</i> mit bisherigen Stämmen.....	83
3.5.2 Effizienz von <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> $\Delta$ <i>sgdh::fdh</i> bei Kultivierung auf Fruktose.....	84
3.5.3 Saccharosemetabolismus in <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> $\Delta$ <i>sgdh::fdh inv</i> .....	90
3.5.3.1 Saccharosespaltung und 5-KF-Produktion aller <i>fdh</i> -Integrationsstämmen im Vergleich .....	92
3.5.3.2 Optimierung der Saccharosespaltung durch Integration von <i>inv1417</i> ins Genom	93
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>98</b>
4.1 Einsatz von Zuckerersatzstoffen in Lebensmitteln.....	99
4.1.1 Synthetisch hergestellte Süßstoffe .....	99
4.1.2 Zuckerersatzstoffe natürlicher Herkunft .....	102
4.1.3 Die natürliche Verbindung 5-KF als alternatives Süßungsmittel.....	103
4.1.3.1 Eigenschaften von 5-KF und Vorkommen in der Natur.....	103
4.1.3.2 Verstoffwechslung und kalorischer Wert von 5-KF .....	104
4.2 Stand der 5-KF-Produktion zu Beginn dieser Arbeit.....	105
4.3 Saccharose als alternatives Substrat für die 5-KF-Produktion .....	108
4.3.1 Industrielle Herstellung von Saccharose als Ausgangsstoff für die 5-KF-Synthese...	109

4.3.2 Gewinnung von Fruktose und Nachteile der Verwendung des Monosaccharids als Substrat für die 5-KF-Produktion .....	109
4.4 Einsatz von <i>Gluconobacter</i> -Stämmen zur Synthese von 5-KF.....	110
4.5 Auswirkungen verschiedener Signalpeptide auf die hydrolytische Aktivität von SacC im Periplasma von <i>G. oxydans</i> .....	111
4.5.1 Signalpeptid-vermittelter Proteintransport in <i>G. oxydans</i> .....	113
4.5.2 Mögliche Gründe für eine unzureichende Translokationen von SacC im Rahmen dieser Arbeit.....	114
4.6 Optimierung der Saccharosespaltung durch die Invertase1417.....	116
4.6.1 Saccharose-spaltende Enzyme innerhalb der Gattung <i>Gluconobacter</i> .....	116
4.6.2 Charakterisierung von Inv1417 .....	117
4.6.3 Tat-vermittelter Transport von Inv1417 und Nachweis der Proteinlokalisierung .....	118
4.6.4 Potential von Inv1417 zur Erweiterung der 5-KF-Produktion auf alternative Substrate .....	119
4.7 Produktion des alternativen Süßstoffs 5-KF mit verschiedenen Ein-Stamm-Systemen ...	121
4.7.1 Einsatzmöglichkeiten von <i>G. japonicus</i> LMG 26773 im Lebensmittelsektor .....	121
4.7.2 <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh inv</i> als Ein-Stamm-System zur Synthese von 5-KF aus Saccharose .....	122
4.7.3 Glukosemetabolismus in <i>G. oxydans</i> .....	125
4.7.4 Abbau von 5-KF durch <i>Gluconobacter</i> -Stämme .....	126
4.8 Möglichkeiten zur Optimierung des Ein-Stamm-Systems.....	129
4.8.1 Erstellen einer Doppelintegrationsmutante zur Steigerung der FDH-Aktivität.....	129
4.8.2 Umstrukturierung des Systems durch chromosomale Integration von <i>inv1417</i> .....	132
4.8.3 Steigerung der 5-KF-Ausbeute durch Integration einer Glukose-Isomerase in den Produktionsprozess .....	134
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>137</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>163</b>
<b>8. Publikationsliste.....</b>	<b>165</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Cef	Cefoxitin
Cyt c	Cytochrom c
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii/et aliae (und andere)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDH	Fruktose-Dehydrogenase
5-FC	5-Fluorocytosin
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramm
GRAS	Generally Recognized As Safe (allgemein sicher)
h	Stunde
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Inv1417	Invertase aus <i>Gluconobacter japonicus</i> LMG 1417
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
KbE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilo-Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
5-KF	5-Ketofruktose bzw. 5-Keto-D-Fruktose
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
l	Liter

LB	Lysogeny Broth
mg	Milligramm
mGDH	membrangebundene Glukose-Dehydrogenase
min	Minute
mM	milimolar [mmol/L]
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-chain-reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMS	Phenazinmethosulfat
QH <sub>2</sub>	Ubichinol
RI	Brechungsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGDH	lösliche Glukose-Dehydrogenase
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/v]	Gewicht pro Volumen
YF	Hefeextrakt-Fruktose
YM	Hefeextrakt-Mannitol
YS	Hefeextrakt-Saccharose
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# 1. Einleitung

## 1.1 Folgen zuckerreicher Ernährung und Relevanz alternativer Süßstoffe

Übergewicht, Fettleibigkeit und Diabetes sind in der heutigen Gesellschaft längst keine seltenen Krankheiten mehr. In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz dieser Erkrankungen insbesondere in der westlichen Welt enorm zugenommen und kann mit einer kalorienreichen Ernährungsweise und einem übermäßigen Konsum von Zuckern in Verbindung gebracht werden (Montonen et al. 2007; Brownell et al. 2009; Malik und Hu 2012; MacDonald 2016; Stanhope 2016). Einer der Hauptgründe für die Aufnahme unverhältnismäßig hoher Mengen an Zuckern, vor allem Saccharose und Fruktose, stellt der massive Zusatz dieser Stoffe in verschiedensten Lebensmitteln dar (Livesey und Taylor 2008; Malik et al. 2010; Aragno und Mastrocola 2017). Dies betrifft insbesondere süße Getränke wie Limonaden oder Säfte, Backwaren und Süßigkeiten, aber auch Fertiggerichte. Die durch den Zuckerzusatz herbeigeführte Süße macht das Produkt geschmacklich besonders attraktiv, was aus Sicht der Lebensmittelindustrie den positiven Effekt hat, dass der Verbraucher größere Mengen konsumiert und die Verkaufszahlen steigen (Wang et al. 2009; Fortuna 2012; Aragno und Mastrocola 2017; Carocho et al. 2017). Dank des heutigen Forschungsstandes entwickeln jedoch immer mehr Konsumenten ein Bewusstsein für die negativen Folgen der zuckerreichen Ernährung auf die Gesundheit. Dies führt zu einem steigenden Interesse an Produkten mit reduziertem Zucker- und Energiegehalt, was durch den Austausch kalorienreicher Zucker gegen kalorienarme Süßstoffe, die idealerweise den gleichen süßen Geschmack bieten, erzielt werden kann (Montonen et al. 2007; Aragno und Mastrocola 2017; Mooradian et al. 2017).

Generell finden bereits sowohl synthetisch hergestellte als auch natürlich vorkommende Süßstoffe einen Einsatz in Lebensmitteln. Synthetische Süßungsmittel, wie Aspartam, Acesulfam K, Saccharin und Sucralose sind durch eine hohe Süßkraft, gemessen an Saccharose, charakterisiert. Sucralose ist beispielsweise etwa 800-mal süßer als Saccharose, während die Süßkraft von Aspartam, Acesulfam K und Saccharin 200- bis 300-mal höher ist (Cardello et al. 1999; Kuhn et al. 2004; Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017). Dies hat den Vorteil, dass nur geringe Mengen dieser Verbindungen in Lebensmittel eingesetzt werden müssen, um eine mit Saccharose vergleichbare Süße zu erzielen. Dadurch sind diese Stoffe eine kalorienfreie Alternative zu herkömmlichen Zuckern. Die hohe Süßkraft wird jedoch vom Konsumenten oft in Form eines künstlichen, bitteren Nachgeschmacks wahrgenommen und stellt daher einen Nachteil der genannten Süßstoffe dar. Vor allem für Sucralose, Saccharin und Acesulfam K ist dies bekannt (Kuhn et al. 2004; Mooradian et al. 2017). Auch die gesundheitlichen Risiken eines regelmäßigen Verzehrs synthetischer Süßungsmittel sind noch nicht ausreichend erforscht (Weihs und Diehl 2004; Belpoggi et al. 2006; Soffritti et al. 2006; Whitehouse et al. 2008; Mooradian et al. 2017). Einige Studien beschreiben, dass die Einnahme artifizierlicher Süßstoffe beim Menschen zu Blähungen und allgemeinen Unverträglichkeiten sowie zu Veränderungen der Darmmikrobiota und zu Glukoseintoleranz führen kann (Mattes und Popkin 2009; Suez et al. 2014; Suez et al. 2015;

Bian et al. 2017), während andere Ergebnisse hingegen die Verträglichkeit dieser Verbindungen belegen (Grotz und Munro 2009; Shankar et al. 2013; Kirkland und Gatehouse 2015; Berry et al. 2016). Die widersprüchliche Datenlage und die Sorge um negative gesundheitliche Folgen durch einen regelmäßigen Verzehr, führen zu einer steigenden Nachfrage an pflanzlichen Zuckeraustauschstoffen. Diese werden aufgrund des natürlichen Vorkommens in einigen Konsumgütern vom Verbraucher als sicherer und verträglicher eingeschätzt (Philippe et al. 2014; Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017).

Zu den natürlich vorkommenden Zuckerersatzstoffen zählen beispielsweise Steviolglykoside, die Zuckeralkohole Xylitol, Sorbitol und Erythritol sowie Tagatose und Allulose (Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017). Steviolglykoside besitzen eine Süßkraft, die etwa 300-mal höher ist als Saccharose. Daher wird die Verbindung für eine vergleichbare Süße nur in geringen Mengen in Lebensmitteln eingesetzt und gilt als kalorienfrei (González et al. 2014; Hellfritsch et al. 2012). Produkte, die mit Steviolglykosiden gesüßt werden, sind jedoch genau wie synthetische Süßungsmittel durch einen bitteren Nachgeschmack charakterisiert (Savita et al. 2004; Yadav et al. 2011; Espinoza et al. 2014). Die Zuckeralkohole Xylitol, Sorbitol und Erythritol sowie die seltenen Monosaccharide Tagatose und Allulose haben in Relation zu Saccharose nur eine vergleichbar hohe oder geringere Süßkraft, weisen aber einen niedrigeren Kaloriengehalt auf (Oku und Okazaki 1996; Levin 2002; Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017). Die genannten Verbindungen sind durch einen neutralen, nicht künstlichen Geschmack charakterisiert (Ghosh und Sudha 2012, Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017), können jedoch teilweise vom menschlichen Metabolismus verstoffwechselt werden und besitzen daher einen eigenen kalorischen Wert (Hyvönen et al. 1982; Oku und Okazaki 1996; Levin 2002; Vastenavond et al. 2012; Grembecka 2015). Die bisher beschriebenen Nebenwirkungen, die lediglich bei einem übermäßigen Konsum natürlicher Süßungsmittel auftraten, belaufen sich auf Magen-Darm-Beschwerden und Durchfall (Mooradian et al. 2017). Die Suche nach weiteren kalorienarmen oder sogar kalorienfreien Süßstoffen natürlichen Ursprungs, die zudem einen neutralen Geschmack aufweisen, ist daher aktuell von großer Bedeutung (Weihrauch und Diehl 2004; Soffritti et al. 2006; Philippe et al. 2014).

## **1.2 Eigenschaften von 5-Ketofruktose als potentiell Süßungsmittel**

Die Verbindung 5-Ketofruktose (5-KF) wurde erstmals im Jahr 1960 in einer Kultivierung von *Gluconobacter (G.) cerinus* in Fruktose-haltigem Medium sowie kurze Zeit später als Nebenprodukt bei der Synthese von Kojisäure durch *Acetobacter*-Stämme identifiziert (Weidenhagen und Bernsee 1960; Terada et al. 1961). Vermittelt durch eine membrangebundene Fruktose-Dehydrogenase erfolgt die Oxidation von D-Fruktose zu 5-Keto-D-Fruktose (Englard und Avigad 1965), weshalb die Verbindung sich von dem Ausgangssubstrat Fruktose durch eine zweite Ketogruppe am C5-Atom unterscheidet (Abb. 1). Aufgrund mehrerer Eigenschaften stellt 5-KF eine vielversprechende Alternative zu kalorienreichen Zuckern und bisherigen Süßstoffen dar. Dazu zählt, dass die Verbindung in der Natur beispielsweise an botrytisierten Trauben durch

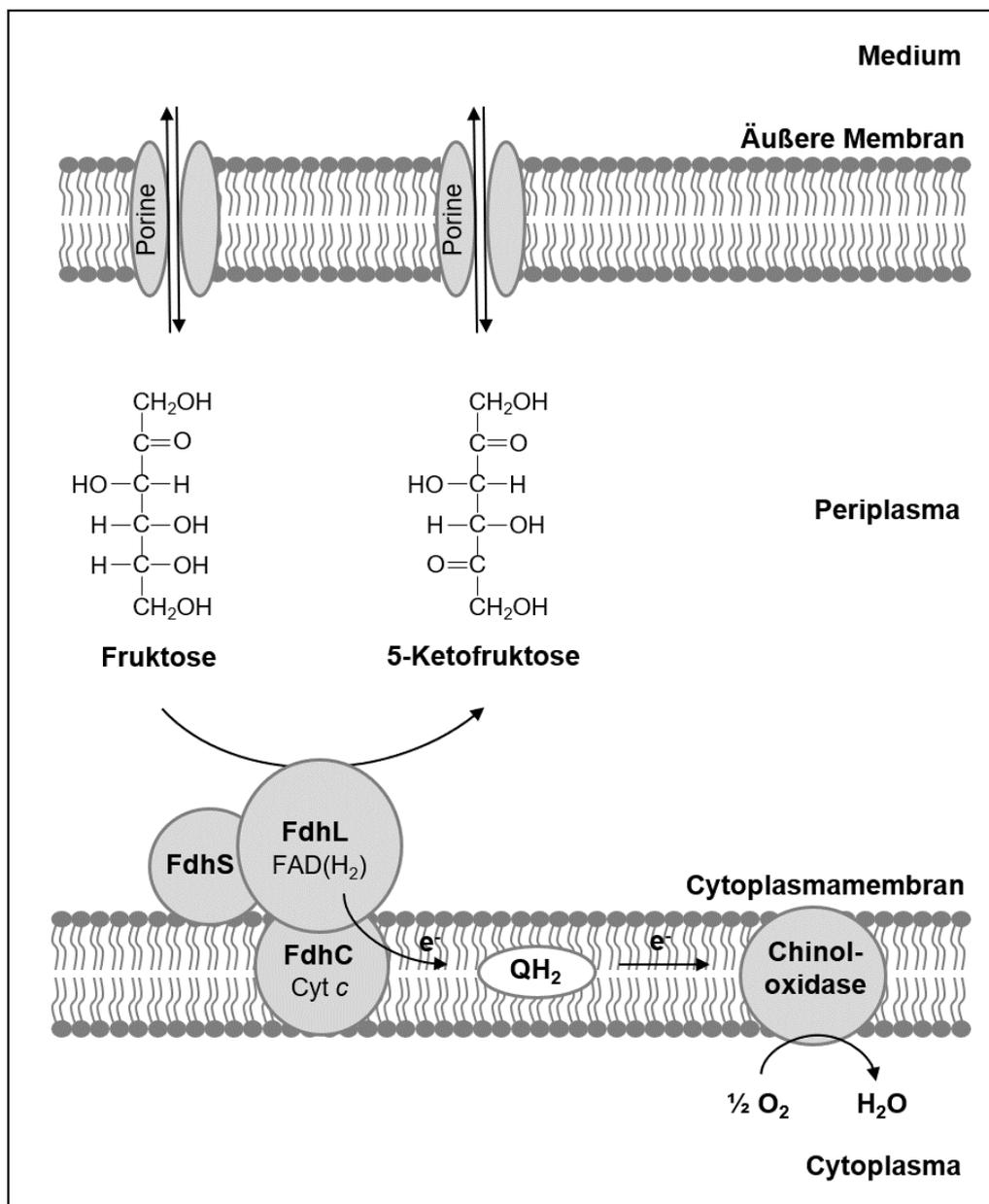
*Gluconobacter*-Stämme gebildet werden kann und bereits natürlicherweise in einigen Konsumgütern wie Essig, Weißwein und Honig vorkommt (Barbe et al. 2000; Barbe et al. 2001; Blasi et al. 2008; Siemen et al. 2018). Als natürlicher Inhaltsstoff einiger Lebensmittel gilt 5-KF allgemein als verträglicher und sicherer, als synthetische Süßungsmittel, deren Einfluss auf die menschliche Gesundheit noch nicht ausreichend untersucht ist (Weihrauch und Diehl 2004; Belpoggi et al. 2006; Soffritti et al. 2006). 5-KF ist außerdem durch eine natürliche Süße ohne bitteren Nachgeschmack charakterisiert, die mit der von Fruktose vergleichbar ist (Herweg et al. 2018). Damit weist die Verbindung einen weiteren Vorteil gegenüber synthetischen Süßungsmitteln und auch Stevioglykosiden auf, deren bitterer Nachgeschmack häufig kritisiert wird (Kuhn et al. 2004; Savita et al. 2004; Yadav et al. 2011; Espinoza et al. 2014; Mooradian et al. 2017). Zudem kann 5-KF nach bisherigem Forschungsstand nicht vom menschlichen Verdauungssystem verstoffwechselt werden und beeinflusst ebenfalls nicht die normale Fruktoseaufnahme im Dünndarm von Säugetieren (Guy und Deren 1971; Wyrobnik und Wyrobnik 2009; Wyrobnik et al. 2013). Neueste Studien belegen außerdem, dass 5-KF von 15 der häufigsten Darmbakterien nicht abgebaut werden kann (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.), weshalb die Verbindung bisher als kalorienfrei eingestuft werden könnte. Die genannten Eigenschaften verdeutlichen, dass 5-KF eine optimale Alternative zu bisher eingesetzten Süßungsmitteln darstellt, weshalb die Etablierung eines industriellen Produktionsprozesses von großem Interesse ist.

### **1.3 Methoden zur Produktion von 5-KF**

Seit der Entdeckung von 5-KF durch Weidenhagen und Bernsee (1960) wurden nur wenige Verfahren zur Produktion des alternativen Süßungsmittels entwickelt. Neben einer chemischen Synthese ausgehend von Fruktose sind auch enzymatische Methoden mit aufgereinigtem Enzym und bakterielle Expressionssysteme zur Produktion von 5-KF aus L-Sorbose oder D-Fruktose beschrieben (Huwig et al. 1994; Heinen et al. 1997; Schneider et al. 2012; Kawai et al. 2013; Siemen et al. 2018). In diesen enzymatischen Ansätzen stellt die membrangebundene Fruktose-Dehydrogenase (FDH, EC 1.1.99.11), welche in verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen identifiziert und charakterisiert werden konnte, das Schlüsselenzym der Oxidationsreaktion dar (Yamada et al. 1966; Ameyama et al. 1981; Kawai et al. 2013).

Der Fruktose-Dehydrogenase-Komplex am Beispiel von *G. japonicus* NBRC3260 besteht aus den drei Untereinheiten FdhL (67 kDa), FdhS (19,7 kDa) und Cytochrom *c* (FdhC, 50,8 kDa) (Ameyama et al. 1981) (Abb. 1). FdhL und FdhS sind im Periplasma lokalisiert und über eine C-terminale Helix der Untereinheit FdhC mit der cytoplasmatischen Membran verankert (Ameyama et al. 1981; Sugimoto et al. 2015). FdhL bildet das aktive Zentrum des Enzyms, in dem C-terminal die Bindestelle für das Substrat Fruktose und N-terminal FAD als Cofaktor identifiziert wurden (Ameyama et al. 1981). Zudem konnten mittels bioinformatischer Analysen in der Cytochrom *c*-Untereinheit (FdhC) drei Häm *c*-Bindemotive nachgewiesen werden (Ameyama et al. 1981). Da FdhL keine bekannte Signalsequenz besitzt, erfolgt der Transport über die Cytoplasmamembran vermutlich gemeinsam mit der Untereinheit FdhS, welche ein Tat-Signalpeptid aufweist (Ameyama

et al. 1981; Kawai et al. 2013). Der Aufbau des Enzymkomplexes erlaubt eine direkte Oxidation von Fruktose zu 5-KF im Periplasma des Organismus über das aktive Zentrum FdhL (Abb. 1). Im Zuge dieser Reaktion wird der Cofaktor FAD zu FADH<sub>2</sub> reduziert. FADH<sub>2</sub> wird anschließend regeneriert. Die freigesetzten Elektronen werden an Häm c der FdhC-Untereinheit abgegeben (Bollella et al. 2018) (Abb. 1) und anschließend über Ubichinon und Chinol-Oxidasen auf den finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen (Deppenmeier und Ehrenreich 2009).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Fruktose-Dehydrogenase-Komplexes in *Gluconobacter*. Das Enzym besteht aus den Untereinheiten FdhL und FdhS, die über FdhC (Cytochrom c, Cyt c) mit der Cytoplasmamembran verbunden sind. Das aktive Zentrum und die Substratbindestelle sind in FdhL lokalisiert, weshalb die Oxidation von Fruktose, die über Porine der äußeren Membran diffundieren kann, direkt periplasmatisch erfolgt. Der Co-Faktor FAD wird im Zuge dessen zu FADH<sub>2</sub> reduziert. Die freigesetzten Elektronen ( $e^-$ ) werden über Häm c der FdhC-Untereinheit auf Ubichinon übertragen, wodurch die reduzierte Form Ubichinol (QH<sub>2</sub>) entsteht. Über die Chinol-Oxidase werden die Elektronen schließlich auf den finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff (O<sub>2</sub>) transferiert.

Das bisher effizienteste bakterielle Expressionssystem zur Synthese von 5-KF basiert auf dem Stamm *G. oxydans fdh*, der Plasmid-vermittelt zur heterologen Produktion der FDH befähigt ist (Siemen et al. 2018). Ausgehend von Fruktose ermöglicht *G. oxydans fdh* die erste 5-KF-Synthese im industriellen Maßstab mit Ausbeuten von bis zu 0,98 g 5-KF/g Fruktose (Herweg et al. 2018). Das Verfahren konnte außerdem auf das alternative Substrat Saccharose erweitert werden. Die Produktion von 5-KF aus dem Disaccharid basiert bislang auf einer Co-Kultivierung der Stämme *G. oxydans ΔtolB-SPpelB-sacC* (nachfolgend als *G. oxydans ΔtolB sacC*) und *G. oxydans fdh* als Zwei-Stamm-System (Siemen et al. 2018). Hierbei erfolgt die Spaltung von Saccharose, die über Porine in der äußeren Membran ins Periplasma des Organismus gelangt, durch *G. oxydans ΔtolB sacC*. Dieser Stamm ist zur heterologen Produktion des Saccharose-spaltenden Enzyms SacC aus *Zymomonas (Z.) mobilis* befähigt, das mit Hilfe der Signalsequenz der Pektatlyase B aus *Pectobacterium (P.) carotovora* ins Periplasma transportiert wird (Kosciow 2017). Die aus der Hydrolyse resultierenden Monosaccharide können über Porine der äußeren Membran ins Medium diffundieren und gelangen schließlich auf dem gleichen Weg ins Periplasma des zweiten Stammes *G. oxydans fdh*. Anschließend kann Fruktose periplasmatisch an der FDH zu 5-KF oxidiert werden, während Glukose beiden Stämmen zur Energiekonservierung und Produktion von Zellmasse dient (vgl. Kapitel 4.2, Abb. 62). Durch das Zwei-Stamm-System konnten 92,5 % der aus der Spaltung resultierenden Fruktoseeinheiten zu 5-KF oxidiert werden (Siemen et al. 2018). Aus unterschiedlichen Gründen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit erörtert werden, ist dieses System jedoch nicht für einen effizienten industriellen Einsatz geeignet.

#### **1.4 Biotechnologische Relevanz der Gattung *Gluconobacter***

Physiologisch zeichnet sich die Gattung *Gluconobacter* durch die metabolische Besonderheit zur unvollständigen Oxidation von Zuckern, Alkoholen und Polyolen, zu Ketonen, Aldehyden und organischen Säuren aus (De Ley et al. 1984; Deppenmeier et al. 2002; De Muynck et al. 2007; Mientus et al. 2017). Die entstandenen Oxidationsprodukte werden nicht weiter verstoffwechselt und können über Porine der äußeren Membran ins Medium abgegeben werden. Aus biotechnologischer Sicht ist dies eine wertvolle Eigenschaft, da die Ansammlung der Produkte im Kulturüberstand eine einfache Aufreinigung erlaubt, wodurch teure Downstreamprozesse zur Aufreinigung und Gewinnung entfallen (De Ley et al. 1984; Gupta et al. 2001; De Muynck et al. 2007). Die Grundlage dieses besonderen Metabolismus bilden membranständige Dehydrogenasen, deren aktives Zentrum im Periplasma lokalisiert ist (Deppenmeier et al. 2002; De Muynck et al. 2007, Deppenmeier and Ehrenreich 2009). Neben der Bildung biotechnologisch relevanter Produkte haben diese Reaktionen den Vorteil, dass freigesetzte Elektronen direkt über den Ubichinonpool der Membran in die Atmungskette eingespeist werden, wodurch Energie konserviert wird.

Aufgrund ihrer natürlichen Habitate, wie Blüten, Nektar oder Früchte, sind *Gluconobacter*-Arten optimal an hohe Zuckerkonzentrationen und niedrige pH-Werte angepasst, was aus industrieller Sicht eine wichtige Rolle spielt (Battey und Schaffner 2001; Gupta et al. 2001; Gullo et al. 2006).

Dadurch sind die Organismen beispielsweise für Fermentationsprozesse, wie die Herstellung von Glukonsäuren aus Glukose im industriellen Maßstab besonders geeignet (Seiskari et al. 1985; Gupta et al. 2001; Deppenmeier et al. 2002; De Muyneck et al. 2007). Auch für den Einsatz als Produktionsorganismen zur Synthese eines Süßstoffs weisen *Gluconobacter*-Stämme daher ein hohes Potential auf. Die Verwendung von *Gluconobacter*-Stämmen in der Produktion wird außerdem durch die Tatsache begünstigt, dass diesen keine pathogenen Effekte für Mensch oder Tier zugeschrieben werden (De Ley et al. 1984; Gupta et al. 2001). Einige Arten der Gattung haben zudem einen sogenannten „GRAS“-Status (generally recognized as safe) und sind für den Einsatz im Lebensmittelbereich zugelassen. Dazu gehört beispielsweise *G. oxydans*, der bereits für die Herstellung von Geschmacksstoffen (Rabenhorst et al. 2001) und Lebensmitteln, wie Bionade® und Kombucha genutzt wird. Weitere wertvolle Produkte, deren Herstellprozesse auf *G. oxydans* basieren, sind L-Sorbose als Vorstufe von Vitamin C, die Feinchemikalien 2- und 5-Ketoglukonat sowie 6-Amino-L-Sorbose für die Synthese des Antidiabetikums Miglitol (Reichstein und Grüssner 1934; Olijve und Kok 1979; Schedel 2000; Gupta et al. 2001; Deppenmeier et al. 2002; De Muyneck et al. 2007; Hancock 2009). Die charakteristischen Eigenschaften und der vermehrte Einsatz zur Herstellung industriell relevanter Produkte verdeutlichen die hohe biotechnologische Relevanz der Gattung *Gluconobacter*.

### **1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Generierung eines *Gluconobacter*-basierten Ein-Stamm-Systems zur Produktion des alternativen Süßstoffs 5-KF aus dem kostengünstigen Substrat Saccharose. Das Verfahren sollte für einen industriellen Einsatz geeignet sein und damit das bisherige Zwei-Stamm-System, das auf *G. oxydans*  $\Delta tolB$  *sacC* und *G. oxydans* *fdh* basierte (Siemen et al. 2018), ersetzen. Obwohl dieses System in einigen Biotransformationen bereits eine 5-KF-Produktionseffizienz von 92,5 % erzielte, ist der Prozess aufgrund der Co-Kultivierung der beiden Stämme nicht optimal an einen industriellen Einsatz angepasst. Dies liegt vor allem an den unterschiedlichen Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme, was zu geringen Aktivitäten der Schlüsselenzyme FDH oder SacC führen kann und damit die Stabilität des Produktionsprozesses negativ beeinflusst.

Für die Entwicklung eines effizienten Ein-Stamm-Systems war zudem eine Optimierung der Saccharosespaltung notwendig. Im bisherigen Zwei-Stamm-System erfolgte die Hydrolyse durch die heterolog produzierte Sucrase SacC, die Sec-abhängig durch eine eingefügte Signalsequenz über die Cytoplasmamembran transportiert wurde (Kosciow 2017). Da SacC jedoch in der verwendeten Mutante *G. oxydans*  $\Delta tolB$  *sacC* nicht ausreichend aktiv im Periplasma vorlag, sollte eine Steigerung der Saccharosespaltung durch den Austausch der eingefügten Signalsequenz erfolgen. Eine weitere Möglichkeit um die Hydrolyse des Disaccharids als initialen Schritt der 5-KF-Produktion aus Saccharose zu optimieren, bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer hydrolytischer Enzyme der Gattung *Gluconobacter*.

Anschließend musste ein geeignetes Expressionssystem entwickelt werden, das die heterologe Produktion der beiden Schlüsselenzyme in einem einzelnen *Gluconobacter*-Stamm erlaubt. Hierzu sollten die benötigten Proteine, die membrangebundene FDH und ein Saccharose-spaltendes Enzym, in großen Mengen gebildet werden. Ein besonderes Augenmerk lag zudem auf den Aktivitäten der beiden Proteine, damit im Vergleich zum bisherigen Zwei-Stamm-System eine stabile Produktion gewährleistet und ein industriell geeigneter Prozess etabliert werden kann. Um mit dem Ein-Stamm-System bereits eine Grundlage für einen wichtigen Meilenstein des generellen 5-KF-Forschungsprojekts zu legen, sollte die Konstruktion des Expressionsstammes dabei so erfolgen, dass die Integration einer Glukose-Isomerase in den finalen Produktionsprozess möglich ist.

Ein letztes Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die bisherige Produktion von 5-KF für den industriellen Einsatz weiter zu optimieren. Daher sollte ein Expressionssystem entwickelt werden, das eine antibiotikafreie Synthese von 5-KF ermöglicht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Programme

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) erworben. Spezielle Kohlenhydrate konnten von Megazyme (Bray, Irland) oder TCI (Eschborn, Deutschland) bezogen werden. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Scientific SE (Luxemburg, Luxemburg) synthetisiert.

#### 2.1.1 Antibiotika und Medienzusätze

Die Antibiotika Cefoxitin, Kanamycin und Ampicillin wurden zum Erhalt der Plasmidstabilität, zur Selektion oder zum Vorbeugen von Kontaminationen eingesetzt. Eine spezifische Selektion von Knock-out Mutanten erfolgte durch Zugabe von 5-Fluorocytosin ins Medium. Regulierbare Promotorsysteme wurden zur Überproduktion von Proteinen mit Anhydrotetracyclin induziert.

**Tabelle 1:** Einsatz von Antibiotika und weiteren Zusätzen

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration im Medium
Cefoxitin	rH <sub>2</sub> O	50 µg/mL
Kanamycin	rH <sub>2</sub> O	50 µg/mL
Ampicillin	50 % EtOH	100 µg/mL
5-Fluorocytosin (5-FC)	rH <sub>2</sub> O	60 µg/mL
Anhydrotetracyclin (AHT)	rH <sub>2</sub> O	0,2 µg/mL

#### 2.1.2 DNA-Polymerasen und Enzyme

Alle Enzyme und Polymerasen, die für Klonierungsvorgänge in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2:** DNA-Polymerase und weitere verwendete Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
Alkalische Phosphatase (FastAP)	Dephosphorylierung von Vektor-DNA am 5'-Ende	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
T4 DNA-Ligase	Verknüpfung von DNA-Fragmenten	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
OneTaq DNA-Polymerase	Kolonie-PCR	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>SacI</i> , <i>Sall</i> , <i>SnaBI</i> , <i>XhoI</i>	Restriktionsverdau	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)

### 2.1.3 DNA- und Protein-Marker

Die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte durch Einsatz des Markers „1 kb DNA-Ladder“ der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland). In Protein-Gelelektrophoresen wurde der Marker „PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) eingesetzt.

### 2.1.4 Software und Internetprogramme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Internetprogramme und Softwares sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3:** Auflistung aller verwendeten Softwares und Programme

Name	Verwendung	Herkunft
Chromas 2.6.5	Prüfen von DNA-Sequenzierungen	Technelysium Pty Ltd
ClarityChrom 8.2.3	Steuerung der HPLC	Knauer GmbH
Clone Manager 9.2	Erstellung von Plasmidkarten	Sci-Ed Software
Clustal Omega	DNA- bzw. Aminosäure Sequenzvergleich	The European Bioinformatics Institute EMBL-EBI (Larkin et al. 2007; Goujon et al. 2010)
GraphPad Prism 8.4	Michaelis-Menten-Kinetik, Analyse von Enzymaktivitäten	GraphPad Software, La Jolla California USA
KEGG	Genanalyse, Nukleotidsequenzen	Kanehisa Laboratories
Microsoft Office 2016	Erstellen von Textdokumenten, Tabellen und Diagrammen	Microsoft
NCBI BLAST	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen	National Center for Biotechnology Information
NEBcalculator	DNA-Konzentrationsbestimmung für die Assemblierung	New England Biolabs, Ipswich, USA
NEBuilder Assembly Tool	Generierung spezifischer Primer für Deletionsplasmide	New England Biolabs, Ipswich, USA
Phobius	Analyse von Signalpeptiden	Stockholm Bioinformatics Center (Käll et al. 2004)
Phyre2	Vorhersage von Proteinstrukturen	Structural Bioinformatics Group (Kelley et al. 2015)
SignalP 5.0	Identifizierung von Signalpeptiden	Center for biological sequence analysis (Petersen et al. 2011)
Spectra Manager™ III Software	Datenauswertung, Ermittlung von Enzymaktivitäten	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland

UCSF Chimera	Proteinmodellierung	University of California, San Francisco (Pettersen et al. 2004)
--------------	---------------------	---

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Organismen

Alle Informationen zu den verwendeten Organismen können Tabelle 4 entnommen werden.

**Tabelle 4:** Eigenschaften und Ursprung aller verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Ursprung
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (DSM 6897)	F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, $\phi$ 80d, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sup>k</sup> -mk <sup>+</sup> ), <i>thi-1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan 1983
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H (DSM 2343)	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	De Ley et al. 1984
<i>Gluconobacter oxydans</i> $\Delta$ <i>hsdR</i> (im Folgenden <i>G. oxydans</i> )	Derivat von <i>G. oxydans</i> 621H (DSM 2343), Deletion des Gens <i>gox2567</i> ( <i>hsdR</i> ), Cef <sup>R</sup>	S. Bringer-Meyer, Forschungszentrum Jülich
<i>Gluconobacter oxydans</i> $\Delta$ <i>tolB</i>	Derivat von <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>hsdR</i> (Deletion von <i>gox1687</i> ), Cef <sup>R</sup>	Kosciow et al. 2016
<i>Gluconobacter oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i>	Derivat von <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>hsdR</i> (Deletion von <i>gox0265</i> und chromosomale Integration von p264- <i>fdhSCL.strep</i> ), Cef <sup>R</sup>	Hoffmann et al. 2020
<i>Gluconobacter oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> $\Delta$ <i>sgdh::fdh</i>	Derivat von <i>G. oxydans</i> $\Delta$ <i>mgdh::fdh</i> (Deletion von <i>gox0265</i> und <i>gox2015</i> und gleichzeitige Integration von p264- <i>fdhSCL.strep</i> ), Cef <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Gluconobacter oxydans</i> IK003.1:: <i>fdhSCL</i> <sup>2</sup>	Derivat von <i>G. oxydans</i> IK003.1 (Integration von p264- <i>fdhSCL.strep</i> zwischen <i>gox0028</i> und <i>gox0029</i> sowie <i>gox0038</i> und <i>gox0039</i> ), Cef <sup>R</sup>	Battling et al. 2020
<i>G. japonicus</i> LMG 1281	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	BCCM LMG 1281
<i>G. albidus</i> LMG 1768	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	BCCM LMG 1768
<i>G. japonicus</i> LMG 26773	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	BCCM LMG 26773
<i>G. japonicus</i> LMG 1417	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	BCCM LMG 1417
<i>G. albidus</i> LMG 1768	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	BCCM LMG 1768

## 2.2.2 Stammerhaltung

Eine kurzzeitige Lagerung einzelner Stämme erfolgte auf Antibiotika-haltigen Agarplatten bei 4 °C. Für die langfristige Lagerung wurden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerin (99,5 %) versetzt und bei -70 °C in Kryoröhrchen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefroren.

## 2.2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Alle angefertigten Medien wurden vor der Verwendung für 20 min bei 121 °C im Autoklav sterilisiert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 1,5 % [w/v] Agar zugegeben. Antibiotika, 5-Fluorocytosin, Salze oder nicht thermostabile Zucker wurden dem Medium bzw. den Agarplatten durch Sterilfiltrieren nachträglich zugegeben.

### 2.2.3.1 Kultivierung von *Gluconobacter*-Stämmen

Vorkulturen aller Stämme der Gattung *Gluconobacter* wurden in Hefeextrakt-Mannitol-Medium (YM) angelegt. Die Kultivierung erfolgte aerob, für 24 - 48 h bei einer Temperatur von 30 °C und 180 rpm. Aufgrund der natürlichen Resistenz wurden alle Kulturansätze mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Cefoxitin versehen, um Kontaminationen zu verhindern. Bei Stämmen, die Expressionsplasmide trugen, wurde dem Medium zusätzlich Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben. Um einer Sauerstofflimitierung entgegenzuwirken, erfolgten die Kultivierungen mit einem Volumen von maximal 5 ml in einem 50 mL Kunststoffröhrchen mit angehobenem Deckel.

#### YM-Medium (Hefeextrakt-Fruktose)

---

Hefeextrakt	6,0 g
Mannitol	20,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Hauptkulturen wurden mit einer Start-OD zwischen 0,05-0,1 der Vorkultur inokuliert. In Abhängigkeit des Experiments erfolgte die Kultivierung in einem Fruktose-haltigen (YF) oder Saccharose-haltigen (YS) Medium. Die Zuckerkonzentrationen lagen hierbei, wenn nicht anders angegeben, zwischen 100-120 mM. Alle Medien wurden mit 50-100 mM MES-haltigem Puffer bei einem pH-Wert von etwa 6,5 versetzt. Um eine ausreichend hohe Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, erfolgten die Kultivierungen in 250 ml Schikanekolben mit einem maximalen Volumen von 100 ml. Die Dauer des Versuches war abhängig vom jeweiligen Ziel, erfolgte aber immer bei einer Temperatur von 30 °C und 180 rpm. Allen Kulturen wurde Cefoxitin (50 µg/ml) sowie plasmidtragenden Stämmen zusätzlich Kanamycin (50 µg/ml) beigefügt.

#### YF-Medium (Hefeextrakt-Fruktose)

---

Hefeextrakt	6,0 g
Fruktose	18,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### **YS-Medium (Hefeextrakt-Saccharose)**

---

Hefeextrakt	6,0 g
Saccharose	34,2 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### **2.2.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli***

Vorkulturen von *Escherichia (E.) coli* DH5 $\alpha$  wurden in 5 ml LB-Medium angelegt und aerob für 24 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Stämme, die ein Expressionsplasmid enthielten, wurden mit Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) versetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden in erster Linie für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte und deren Vervielfältigung nach Transformation eingesetzt. Eine heterologe Produktion von Proteinen erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, ebenfalls in LB-Medium in einem Maßstab von 500 ml mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin. Diese Kulturen wurden 1 %ig aus einer zuvor angelegten Vorkultur inokuliert und aerob bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

### **LB-Medium (Lysogeny Broth, Miller 1972)**

---

Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	10,0 g
NaCl	5,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### **2.2.4 Bestimmung des Wachstums und Berechnung der zugehörigen Parameter**

Das Wachstum aller Bakterienkulturen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch ermittelt. Das verwendete Medium diente dabei als Leerwert. Ab einer optischen Dichte von 0,3 wurden die Proben der Kulturen mit Medium verdünnt, um eine Mehrfachstreuung und damit falsche Zellzahlen zu verhindern. Zur Bestimmung der Wachstumsrate  $\mu$  erfolgte eine logarithmische Auftragung der optischen Dichte gegen die Zeit, wodurch die exponentielle Wachstumsphase des Stammes ermittelt wurde. Die Steigung in diesem Bereich ergab die Wachstumsrate  $\mu$ . Die Verdopplungszeit ließ sich über die Formel  $t_d = \ln(2) / \mu$  berechnen.

### **2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.1 Plasmide und Oligonukleotide**

Alle Plasmide, die in dieser Arbeit für Klonierungen oder Expressionsversuche erstellt und verwendeten wurden, sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Eigenschaften und Ursprung eingesetzter Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Ursprung
pASK-IBA.5 (pASK5)	Mit N-terminalem Strep-Tag II, <i>tetA</i> Promotor/Repressor System, Amp <sup>R</sup>	IBA GmbH
pASK5- <i>inv1417</i>	Derivat von pASK-IBA.5, welches die Gensequenz von <i>inv1417</i> aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 trägt	Hoffmann et al. 2020
pBBR1MCS-2	<i>mob</i> , <i>rep</i> , Kan <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	Kovach et al. 1995
pBBR1p264-ST	Derivat von pBBR1MCS-2, mit Sequenz der 5'-UTR des Gens <i>gox0264</i> und C-terminalem Strep-Tag II, Kan <sup>R</sup>	Zeiser et al. 2014
pBBR1p452	Derivat von pBBR1MCS-2, mit Sequenz der 5'-UTR des Gens <i>gox0452</i>	Kallnik et al. 2010
pBBR1p264- <i>inv1417</i>	Derivat von pBBR1p264, mit dem Gen <i>inv1417</i> aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417	Hoffmann et al. 2020
pBBR1p264- <i>fdhSLC.strep</i>	Derivat von pBBR1p264-ST, trägt die Gensequenzen <i>fdhL</i> , <i>fdhS</i> und <i>fdhC</i> aus <i>G. japonicus</i> NBRC3260	Siemen et al. 2018
pBBR1p452- <i>fdhSLC.strep</i>	Derivat von pBBR1p452 trägt die Gensequenzen <i>fdhL</i> , <i>fdhS</i> und <i>fdhC</i> aus <i>G. japonicus</i> NBRC3260	Siemen 2017
pKOS6b	Vektor für markerlose Deletion, welcher die Sequenzen der Gene <i>codA</i> und <i>codB</i> trägt Kan <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup>	Kostner et al. 2013
pKOS6bΔ <i>mgdh::fdh</i>	Derivat von pKOS6b, dient zur Deletion des Gens <i>gox0265</i> und Integration von p264- <i>fdhSLC</i>	Hoffmann et al. 2020
pKOS6bΔ <i>sgdh::fdh</i>	Derivat von pKOS6b, dient zur Deletion des Gens <i>gox2015</i> und Integration von p264- <i>fdhSLC</i>	Diese Arbeit
pBBR1p264-SP <i>pelB-sacC</i>	Derivat von pBBR1p264-SP <i>pelB</i> Streplong, welches die Sequenz des Gens <i>sacC</i> (ZMO0375) aus <i>Z. mobilis</i> trägt	Kosciow 2017
pBBR1p264-SP <i>gox2219-sacC</i>	Derivat von pBBR1p264-SP <i>pelB-sacC</i> , trägt anstelle des Signalpeptids von <i>PelB</i> die Signalsequenz von <i>Gox2219</i> trägt	Diese Arbeit

<i>pBBR1p264-SPgox0605-sacC</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-SPpelB-sacC</i> , trägt anstelle der Signalsequenz von PelB die Signalsequenz von Gox0605	Diese Arbeit
<i>pBBR1p264-SPgox0748-sacC</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-SPpelB-sacC</i> , mit Signalsequenz von Gox0748 anstelle von PelB	Diese Arbeit
<i>pBBR1p264-SPgox0187-sacC</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-SPpelB-sacC</i> , mit Signalsequenz von Gox0187 anstelle von PelB	Diese Arbeit
<i>pBBR1p264-SPgox0854-sacC</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-SPpelB-sacC</i> , mit der Signalsequenz von Gox0854 anstelle von PelB	Diese Arbeit
<i>pBBR1p264-sacC-noSP</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-SPpelB-sacC</i> , ohne die Signalsequenz von PelB und ohne Strep-Tag	Diese Arbeit
<i>pBBR1p264-sacC-p264-fdh</i>	<i>pBBR1p264-St</i> Derivat zur Co-Expression von <i>sacC</i> , <i>fdhS</i> , <i>fdhC</i> und <i>fdhL</i> mit zwei p264-Promotoren	Siemen et al. 2018
<i>pBBR1p264-inv1417-p264-fdhSCL</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-sacC-p264-fdh</i> , das die Gensequenz <i>inv1417</i> aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 im Austausch gegen <i>sacC</i> trägt	Diese Arbeit
<i>pBBR1p264-inv1417_term_p264-fdhSCL</i>	Derivat von <i>pBBR1p264-inv1417-p264-fdhSCL</i> mit Terminationssequenz des Gens <i>gox0265</i> zwischen den Genen <i>inv1417</i> und <i>fdhSCL</i>	Diese Arbeit
<i>pKOS6bΔImg0644</i>	Derivat von <i>pKOS6b</i> , welches die flankierenden Regionen des Gens <i>Img0644</i> trägt	Diese Arbeit
<i>pBBR1p452-fdhSCL-St</i>	Derivat von <i>pBBR1p452-ST</i> , mit den Gensequenzen <i>fdhL</i> , <i>fdhS</i> und <i>fdhC</i> aus <i>G. japonicus</i> NBRC3260	Siemen 2017
<i>pKOS6bΔmgdh::inv</i>	Derivat von <i>pKOS6b</i> , dient zur Deletion des Gens <i>gox0265</i> und Integration von <i>p264-inv1417</i>	Diese Arbeit
<i>pKOS6bΔsgdh::inv</i>	Derivat von <i>pKOS6b</i> , zur Deletion des Gens <i>gox2015</i> und Integration von <i>p264-inv1417</i>	Diese Arbeit

Die Sequenzen der Primer, die für Klonierungen, Kolonie-PCR oder Sequenzierungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6:** Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide. Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen die Schnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme

Primer	Sequenz	Enzym
pKOS6b.F	aattcgagctcggtaccc	-
pKOS6b.R	cgtaatcatgcatagctgttc	-
Up-gox0265.F	acagctatgacatgattacgtatcgagatcgctcagccatac	-
Up-gox0265.R	caggcgcaacgatgttctctggatctgttg	-
Down-gox0265.F	aaaaataatctctgacaggaccctcggg	-
Down-gox0265.R	atccccgggtaccgagctcgtttcgtgaactgccctgtc	-
p264-fdh.mgdh.F	caggaacatcgttgcgcctgaatgagag	-
p264-fdh.mgdh.R	tcctgtcagagattatcttcgaactgcgg	-
Inv1417_XhoI_for	attactcgagaaggaggaaaaaaaaaatgctgccgggtatgacgga	XhoI
Inv1417_SacI_rev	attagagctcctacatcgccgtaggcg	SacI
inv1417-SalI-for	attagtcgacctacatcgccgtaggcg	SalI
inv1417-HindIII_rev	attaagcttccgaaggaggtccccgatgctgccgggtatg	HindIII
Term_inv1417-fdh_for	cctacggcgatgtaggagcttctgacaggaccctcggg	-
Term_inv1417-fdh_rev	tcattcaggcgcaacgagctacgattgtatcttcgccag	-
SPgox2219.fw	ggtctcgaggaggaatacacttatgaaaacg	XhoI
SPgox2219.rev	gtttacgtatgcatgagcctgacc	SnaBI
SPgox0605.fw	ctcctcgaggagagactgcatgagaaaacg	XhoI
SPgox0605.rev	ctgtacgtaggcattggcgagtgtc	SnaBI
SPgox0748.fw	aacctcgaggaggtttcaatgtccagattgg	XhoI
SPgox0748.rev	gggtacgtacgcctgtgccacaccgg	SnaBI
SPgox0854.fw	ctactcgaggagaggtttcattatggagatcca	XhoI
SPgox0854.rev	gtgactcgagagaaggcctgactgtgc	SnaBI
SPgox0187.fw	attactcgagagggggcaacatcaatgaaa	XhoI
SPgox0187.rev	attatacgtaggcatgagcgggaagggtg	SnaBI
Up-Img0644_900bp.F	acagctatgacatgattacgccgaaatctggacaacac	-
Up-Img0644_900bp.R	tcattcagtggaaaaactcctgccgag	-
Down-Img0644_900bp.F	ggagttttccactgaatgagcaggactttc	-
Down-Img0644_900bp.R	ccgggtaccgagctcgaatttacagacagcaattcaaacg	-

codA.F	tgtggaggctaacagtgtcg	-
codA.R	gataatcaggttggcgctgt	-
p264fdh-strep.for	atccaggaacatccgttgcgcctgaatgag	-
p264fdh-strep.rev	gggtcctgtcagattatcttgcgaactgcgggtg	-
up-gox2015.F	acagctatgacatgattacggatgctcgaccgcagcgg	-
up-gox2015.R	aggcgcaacgctggcctcacctctccttg	-
down-gox2015.F	cgaaaaataaacttatatggccccttccc	-
down-gox2015.R	ccgggtaccgagctcgaattggatgcaggccatgttgc	-
p264-fdh.sgdh.F	gtgaggccagcgttgcgcctgaatgagag	-
p264-fdh.sgdh.R	ccatataagttatcttgcgaactgcgggtg	-
up-0265.inv-F	acagctatgacatgattacgtatcgagatcgtagccatac	-
up-0265.inv-R	aggcgcaacggatgttctctggatctgttg	-
down-0265.inv-F	ggcgtatgtagtctgacaggaccctcggg	-
down-0265.inv-R	ccgggtaccgagctcgaattctgtgaactggccttgtc	-
p264-inv.mgdh-F	caggaacatccgttgcgcctgaatgagag	-
p264-inv.mgdh-R	tcctgtcagactacatcgccgtagggcg	-
up-2015.inv-F	acagctatgacatgattacgcccacaccacggacatg	-
up-2015.inv-R	caggcgcaacgtctgtctccctgcaaagatg	-
down-2015.inv-F	ggcgtatgtaggaatattccccttagc	-
down-2015.inv-R	atccccgggtaccgagctcgcactgtatgtatcggcattg	-
p264-inv1417.2015-F	ggagacagacggttgcgcctgaatgagag	-
p264-inv1417.2015-R	ggaatattccctacatcgccgtagggcg	-

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur Vervielfältigung gezielter DNA-Abschnitte (Mullis et al. 1986). Der Vorgang besteht grundsätzlich aus den drei Schritten Denaturierung, Anlagerung und Elongation, die sich zyklisch wiederholen. Mit jedem Zyklus wird die Anzahl des DNA-Fragments verdoppelt, was zu einem exponentiellen Anstieg des Amplifikats führt.

Die Reaktion startet durch eine Initialdenaturierung, um eine vollständige Trennung des DNA-Doppelstranges, der als Vorlage verwendet wird, zu gewährleisten. Anschließend folgt der eigentliche Denaturierungsschritt, der bei 94 - 98 °C, je nach verwendeter DNA-Polymerase, stattfindet. An die so entstandenen, komplementären DNA-Einzelstränge lagern sich die verwendeten Primer bei einer Primer-spezifischen Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) an. Dabei entstehen Doppelstrang-Fragmente mit einem freiem 3'-OH-Ende. Durch den letzten Schritt des Zyklus, die

Elongation, werden freie Nukleotide komplementär an das freie 3'-OH-Ende angelagert. Diese Reaktion wird durch eine geeignete, hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert. Dabei entsteht ein neues, doppelsträngiges DNA-Fragment. Die Dauer und Temperatur des Elongationsschrittes sind abhängig von der Größe des gewünschten PCR-Produktes und der eingesetzten DNA-Polymerase. Nach Durchlauf aller Zyklen endet die PCR mit einem finale Elongationsschritt.

### 2.3.2.1 Amplifizierung von Genen

Zur Amplifizierung von Genen für die Erstellung von Expressionssystemen wurde die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) mit einer Umsatzrate von 20 sec/kb eingesetzt. Diese DNA-Polymerase besitzt eine geringe Fehlerrate (nach Angaben des Herstellers etwa 280 x genauer als die Taq-Polymerase) und war somit optimal für eine fehlerfreie Amplifikation. Der PCR-Ansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 7 und 8 aufgeführt.

**Tabelle 7:** PCR-Ansatz zur Gen-Amplifizierung mittels Q5 DNA-Polymerase

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
5x Q5 Reaction Buffer	10
5x Q5 High GC Enhancer	10
Forward-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1
Reverse-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1
dNTP-Mix (25 mM)	0,5
DNA	0,25
Q5 DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	1
rH <sub>2</sub> O	ad 50

**Tabelle 8:** Reaktionsbedingungen zur Gen-Amplifizierung mittels Q5 DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialdenaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	10 s
Annealing	T <sub>A</sub> °C	20 s
Elongation	72 °C	20 sec/kb
Finale Elongation	72 °C	3 min
Lagerung	4 °C	$\infty$
30x zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation		

T<sub>A</sub>: Anlagerungstemperatur der Primer

### 2.3.2.2 Kolonie-PCR

Um generierte Stämme auf die Aufnahme des korrekten Plasmids zu überprüfen, erfolgte der Nachweis mit Hilfe einer Kolonie-PCR. Dafür wurden einzelne Klone gepickt, in 10 µl rH<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 5 µl für den Reaktionsansatz eingesetzt (Tab. 9). Zur Durchführung der Kolonie-PCR wurde grundsätzlich die *OneTaq* DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Diese weist eine höhere Fehlerrate als die Q5 Polymerase auf, da keine Korrekturlesefunktion vorlag. Zudem war die Umsatzrate der *OneTaq* Polymerase mit 1 min/kb langsamer. Das eingesetzte PCR-Programm kann Tabelle 10 entnommen werden.

**Tabelle 9:** PCR-Ansatz für die Kolonie-PCR mit *OneTaq* DNA-Polymerase

Komponente	Volumen [µl]
5x One Taq Reaction Buffer	5
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5
dNTP-Mix (25 mM)	0,5
DNA	5
<i>OneTaq</i> DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,125
rH <sub>2</sub> O	ad 25

**Tabelle 10:** Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR mit *OneTaq* DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialdenaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	10 s
Annealing	T <sub>A</sub> °C	20 s
Elongation	72 °C	20 sec/kb
Finale Elongation	72 °C	3 min
Lagerung	4 °C	∞
30x zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation		

T<sub>A</sub>: Anlagerungstemperatur der Primer

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe verwendet und fand damit Einsatz bei der Überprüfung mittels PCR generierter Amplifikate. Die Längenbestimmung linearer, doppelsträngiger DNA erfolgte dabei durch das Mitführen eines DNA-Markers mit bekannten Größen. Die Methode basiert auf der Wanderung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente war umgekehrt proportional, was bedeutet, dass kleine Moleküle schneller durch das Gel wanderten als große. Durch Variationen der Porengröße, die abhängig von der eingesetzten

Agarosekonzentration war, konnte die Wanderungsgeschwindigkeit verändert werden. Je höher die Agarose-Konzentration des Gels, desto kleiner die Poren und entsprechend langsamer wanderten die DNA-Fragmente.

In dieser Arbeit wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden 0,3 g Agarose in 30 ml 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) aufgekocht, mit 1 µl GelRed versehen und in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen.

#### **50x TAE-Puffer, pH 8**

---

Tris	242 g
EDTA (0,05 M)	100 ml
Essigsäure (1 M)	57,4 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Nach vollständigem Aushärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Alle DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der 1 kb DNA-Marker der Firma NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 50 min. Durch das im Gel enthaltene GelRed konnten die DNA-Banden unter UV-Licht bei 254 nm visualisiert werden. Die Dokumentation erfolgte durch eine spezielle Anlage der Firma INTAS (INTAS GmbH Digital Imaging and Microscopy, Göttingen, Deutschland).

#### **2.3.4 Isolierung von DNA und Plasmiden**

Die Isolierung von Plasmiden und DNA erfolgte mit Hilfe des Monarch® Plasmid Miniprep Kits (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers. Zur Gewinnung der DNA wurden jeweils 4 ml einer plasmidtragenden Übernachtskultur verwendet. Um PCR-Amplifikate und geschnittene DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte oder Sequenzierungen zu reinigen, wurde das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellvorschrift verwendet. Beide Methoden beruhen auf der Bindung und spezifischen Elution der gewünschten DNA über eine Säule, wodurch Verunreinigungen entfernt wurden.

#### **2.3.5 Restriktionsverdau und Ligation**

Zur Vorbereitung von DNA-Fragmenten und Plasmiden für die Ligation erfolgte ein Restriktionsverdau mit Hilfe von Endonukleasen, die Phosphodiesterbindungen eines DNA-Doppelstranges an einer spezifischen Erkennungssequenz spalteten. Dadurch entstanden entweder DNA-Fragmente mit glatten Enden oder kohäsive Enden mit Nukleotid-Überhängen. Durch Einsatz der gleichen Restriktionsenzyme für Vektor und Insert wurden zueinander komplementäre Enden gebildet. Die optimalen Reaktionsbedingungen, das Puffersystem und die Enzymmengen, die für die Durchführung eingesetzt werden sollten, wurden durch das Onlineprogramm Double-Digest (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) ermittelt.

Alle Ansätze wurden in einem Volumen von 30 µl angelegt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von weiteren 50 % der anfänglichen Enzymmenge verstärkt. Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektorrückgrats zu verringern, wurde zudem 1 µl alkalische Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) zu jedem Versuchsansatz mit Vektor-DNA hinzugegeben, wodurch diese am 5'-Ende dephosphoryliert wurde. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 30 min wurden der Restriktionsverdau durch einen Aufreinigungsschritt mittels Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) beendet.

Nach dem Restriktionsverdau erfolgte eine Ligation der aufgereinigten DNA-Fragmente mit dem jeweiligen Vektorrückgrat. Durch den Einsatz einer T4 DNA-Ligase konnten Vektor- und Insert-DNA, die durch die Endonukleasen kompatible Schnittstellen zueinander aufwiesen, unter ATP-Verbrauch miteinander verknüpft werden. Der Reaktionsansatz erfolgte in einem Volumen von 20 µl für 1h bei Raumtemperatur (RT). Die Reaktion wurde durch einen Hitzeinaktivierungsschritt bei 65 °C für 10 min abgestoppt.

#### **Reaktionsansatz zur Ligation**

---

Insert-DNA	12 µl
Vektor-DNA	4 µl
PEG 4000	1 µl
10 x T4 Ligasepuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl

#### **2.3.6 Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli* DH5α Zellen**

Die Übertragung ligierter Plasmide in kompetente *E. coli* DH5α Zellen erfolgte durch einen Hitzeschock. Der Stamm ist genetisch so modifiziert, dass der Abbau von Fremd-DNA stark eingeschränkt ist, weshalb er sich für die Vervielfältigung von rekombinanten Konstrukten eignet.

Von den kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen wurden 10 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 2 µl des Ligationsansatzes versehen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec. Nach einem weiteren 5-minütigen Inkubationsschritt auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln regeneriert. Davon wurden anschließend jeweils 100 µl auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (im Fall von pBBR1-Plasmiden) oder Ampicillin (für pASK5-Vektoren) ausplattiert. Zusätzlich wurden die verbleibenden 900 µl pelletiert, im Rücklauf resuspendiert und ebenfalls auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum gegeben. Alle Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Screening erfolgte bei allen verwendeten Stämmen zunächst mittels Kolonie-PCR (2.3.2.2) und anschließend durch eine Sequenzierung.

### 2.3.7 Elektroporation zur Transformation in *Gluconobacter*-Stämme

Die Übertragung von Plasmiden in die verwendeten Stämme *G. oxydans*, *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281 erfolgte mittels Elektroporation (modifiziert nach Mostafa et al. 2002). Zuerst musste eine Vorkultur des jeweiligen *Gluconobacter*-Stammes angelegt und über Nacht bis zu einer optischen Dichte von 0,8-1 kultiviert werden. Alle folgenden Schritte wurden unter Kühlung der Proben auf Eis durchgeführt. 2 x 2 ml der Kultur wurden in sterilen Eppendorfgefäßen bei 4 °C und 8000 rpm pelletiert und zweimal mit kalten, sterilen 1 mM HEPES-Puffer gewaschen (13000 x g, 2 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 50 µl 10 %iges Glycerin (4 °C, steril) resuspendiert und 2 µl des zu transformierenden Plasmids zugegeben. Die Suspension aus vorbereiteten Zellen und Plasmid wurde vorsichtig und luftblasenfrei in gekühlte Elektroporationsküvetten mit einer Elektrodendistanz von 1 mm (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) überführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Hilfe eines MicroPulsers (BioRad, München, Deutschland) einem elektrischen Impuls von 2,2 kV für 4-5 ms ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Regeneration in einem 15 ml Falcon mit 1 ml Elektroporationsmedium (EP-Medium). Die Zellen wurden für 4 h bei 30 °C unter schütteln inkubiert und dann auf YM-Agarplatten mit Cefoxitin und Kanamycin ausplattiert. Die Aufnahme des Plasmids wurde durch eine Kolonie-PCR (2.3.2.2) überprüft.

#### Elektroporationsmedium (EP-Medium)

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

Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit HCl auf pH 6 eingestellt. Die für das EP-Medium verwendeten Bestandteile MgSO<sub>4</sub> und CaCl<sub>2</sub> wurden 100-fach konzentriert angesetzt, sterilfiltriert und erst nach der Sterilisation zum restlichen Ansatz hinzugefügt.

### 2.3.8 Markerlose Deletion von *Img0644*

Die Generierung aller Deletions- und Integrationsvektoren erfolgte im Zuge dieser Arbeit durch eine Assemblierung nach Angaben des Herstellers NEB (Frankfurt am Main, Deutschland). Als Basis wurde der Vektor pKOS6b verwendet, der eine markerlose Deletion erlaubte (Kostner et al. 2013).

#### 2.3.8.1 Erstellen von Deletionskonstrukten mittels Assemblierung am Beispiel von pKOS6bΔ*Img0644*

Für die Deletion von *Img0644* wurden neben dem Vektorrückgrat pKOS6b zwei flankierende DNA-Fragmente oberhalb- und unterhalb des Gens benötigt. Die Amplifizierung erfolgte mittels Q5 DNA-Polymerase und dem dafür vorgesehenen PCR-Programm (2.3.2.1), die benötigten

Oligonukleotide sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Das Vektorrückgrat wurde mit Hilfe der Primer pKOS6b.F/R und aufgereinigter Plasmid-DNA amplifiziert. Die flankierenden 900 bp großen DNA-Fragmente oberhalb- und unterhalb von *Img0644* wurden aus genomischer DNA von *G. japonicus* LMG 26773 mit Hilfe der Primer Up-*Img0644\_900bp.F/R* und Down-*Img0644\_900bp.F/R* erstellt. Alle Oligonukleotide wurden über das NEBuilder® Assembly Tool (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) generiert und so konstruiert, dass Fragmente mit komplementären Überhängen zueinander amplifiziert wurden. Über diese wurde die Verknüpfung in der richtigen Orientierung bei der Assemblierung gewährleistet.

Nach einem Aufreinigungsschritt der Amplifikate durch das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) wurde die Konzentration dieser am Nanodrop bestimmt. Die Assemblierung und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die Inkubation des fertigen Ansatzes wurde für 15 min bei 50 °C durchgeführt.

#### **Reaktionsansatz zur Assemblierung von pKOS6bΔ*Img0644***

pKOS6b-Vektorrückgrat	0,05 pmol
up- <i>Img0644</i>	0,1 pmol
down- <i>Img0644</i>	0,1 pmol
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µl
rH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Das resultierende Plasmid pKOS6bΔ*Img0644* wurde in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen eingebracht (vgl. Kapitel 2.3.6), vervielfältigt, mittels Monarch® Plasmid Miniprep Kit (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) isoliert und sequenziert.

#### **2.3.8.2 Vorgang der markerlosen Deletion über homologe Rekombination**

Die Transformation von pKOS6bΔ*Img0644* in *G. japonicus* LMG 26773 erfolgte durch Elektroporation (vgl. Kapitel 2.3.7) mit anschließender Selektion der Transformanten auf Kanamycin-haltigen Agarplatten durch einen aeroben Kultivierungsschritt über Nacht bei 30 °C. Da der Vektor pKOS6bΔ*Img0644* im Empfängerorganismus nicht replizierbar war, konnten nur Zellen, die den Vektor über eine erste homologe Rekombination vollständig in das Genom integriert hatten, auf den Antibiotika-haltigen Agarplatten wachsen. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR (vgl. Kapitel 2.3.2.2) wurden gewachsene Klone auf das im Vektorrückgrat befindliche Gen *codA* unter Verwendung der Primer *codA.F/codA.R* überprüft. Klone, die ein passendes Fragment aufwiesen und damit eine erste homologe Rekombination durchgeführt hatten, wurden für den Vorgang der zweiten homologen Rekombination eingesetzt. Dies erfolgte durch eine aerobe Kultivierung bei 30 °C und 180 rpm in frischem YM-Medium mit Cefoxitin über Nacht und anschließend durch einen weiteren Selektionsschritt auf 5-Fluorocytosin-haltigen Agarplatten (60 µg/ml 5-FC).

5-Fluorocytosin (5-FC) diente in diesem System als Selektionsmarker, da es durch die heterolog produzierte Cytosin-Deaminase (*CodA*) und Cytosin-Permease (*CodB*), deren Gene als

Vektorrückgrat von pKOS6b $\Delta$ *Img0644* ebenfalls in das Genom von *G. japonicus* LMG 26773 integriert wurden, zu toxischem 5-Fluorouracil (5-FU) umgewandelt wurde (Kostner et al. 2013). Zellen, die durch eine zweite homologe Rekombination einen spontanen Verlust dieser Gene aus der genomischen DNA durchführten, konnten auf den Selektionsplatten überleben. Durch diesen Vorgang entstanden entweder Wildtyp-Revertanten oder unter Austausch des Zielgens über die fusionierten Genflanken des Deletionsvektors, die gewünschte Mutante. Zur Identifizierung generierter Mutanten erfolgte der Nachweis des Gens *Img0644* unter Verwendung der Primer Up-*Img0644\_900bp.F*/Down-*Img0644\_900bp.R* mittels Kolonie-PCR (vgl. Kapitel 2.3.2.2). Lagen Revertanten vor, würde dadurch ein Amplifikat mit einer Größe von 2641 bp erwartet, bei Deletion des Gens *Img0644* entstünde lediglich ein Fragment mit einer Größe von 1800 bp.

### 2.3.9 Erstellen von Integrationsstämmen

#### 2.3.9.1 Generierung des Stammes *G. oxydans* $\Delta$ *mgdh::fdh*

Zur Generierung des Stammes *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* wurden die Gene *fdhSCL* unter Kontrolle des starken Promotors p264 (Kallnik et al. 2010) in das Chromosom von *G. oxydans* anstelle des Gens *gox0265* integriert. Dieser Vorgang erfolgte erneut durch Verwendung des pKOS6b-Vektors (Kostner et al. 2013) und die Konstruktion von pKOS6b $\Delta$ *mgdh::fdh* mittels Assemblierung (2.3.8.1).

Für die Integration wurden, anders als bei der reinen Deletion des Gens *Img0644*, insgesamt vier DNA-Fragmente benötigt. Neben der DNA des Vektorrückgrats und den flankierenden 1000 bp großen Bereichen oberhalb und unterhalb von *gox0265*, wurde als viertes Fragment das zu integrierende *fdhSCL*-Gencluster benötigt. Die Amplifizierung aller Fragmente erfolgte mittels Q5 DNA-Polymerase (vgl. Kapitel 2.3.2.1). Zur Amplifizierung der Vektor-DNA wurden erneut die Primer pKOS6b.F/ pKOS6b.R verwendet (vgl. Kapitel 2.3.8.1 und Tab. 6). Mit genomischer DNA von *G. oxydans* erfolgte unter Einsatz der Primer Up-*gox0265.F*/Up-*gox0265.R* und Up-*gox0265.F*/Up-*gox0265.R* die Generierung der Fragmente up-*gox0265* und down-*gox0265* (vgl. Tab. 6). Die Gene *fdhSCL* mit p264-Promotor wurden aus dem Plasmid pBBR1p264-*fdhSLC.strep* durch Verwendung der Oligonukleotide p264-*fdh.mgdh.F*/p264-*fdh.mgdh.R* amplifiziert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem vorherigen Assemblierungsprinzip (vgl. Kapitel 2.3.8.1). Da in diesem Konstrukt vier Fragmenten zusammengefügt wurden erhöhte sich die Inkubationszeit für die Verknüpfung aller Fragmente auf 60 min bei 50 °C. Nach der Assemblierung wurde das erstellte Plasmid pKOS6b $\Delta$ *mgdh::fdh* in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und anschließend mit Hilfe des Monarch® Plasmid DNA Miniprep Kits (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) gereinigt. Die Transformation in *G. oxydans* erfolgte durch Elektroporation (vgl. Kapitel 2.3.7). Die markerlose Deletion von *gox0265* und die gleichzeitige Integration von p264-*fdhSCL* erfolgte erneut über einen 2. homologen Rekombinationsschritt und 5-FC zur Gegenselektion (vgl. Kapitel 2.3.8.2). Die erstellte Mutante wurde mittels Kolonie-PCR durch den Nachweis der FDH-Integration unter Verwendung der Primer p264*fdh-strep.for*/ p264*fdh-strep.rev* verifiziert.

### **Ansatz zur Assemblierung von pKOS6b $\Delta$ mgdh::fdh**

pKOS6b-Vektorrückgrat	0,05 pmol
up-gox0265	0,05 pmol
p264-fdhSCL	0,05 pmol
down-gox0265	0,05 pmol
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 $\mu$ l
rH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

#### **2.3.9.2 Erstellen des Doppelintegrationsstammes *G. oxydans* $\Delta$ mgdh::fdh $\Delta$ sgdh::fdh**

Der Stamm *G. oxydans*  $\Delta$ mgdh::fdh $\Delta$ sgdh::fdh wurde durch eine weitere Gendeletion und gleichzeitige Integration des *fdhSCL*-Genclusters aus dem Stamm *G. oxydans*  $\Delta$ mgdh::fdh erstellt. Als zu deletierendes Gen wurde *gox2015* ausgewählt, welches für die lösliche Glukose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* kodiert. Die Konstruktion des Vektors pKOS6b $\Delta$ sgdh::fdh erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Prinzip (vgl. Kapitel 2.3.8.1 und 2.3.9.1). Zur Generierung der vier benötigten DNA-Fragmente wurden die Primer pKOS6b.F/pKOS6b.R, up-gox2015.F/up-gox2015.R, down-gox2015.F/down-gox2015.R und p264-fdh.sgdh.F/p264-fdh.sgdh.R (Tab. 6) verwendet. Die Amplifikation erfolgte mittels Q5 DNA-Polymerase. Nach vollständiger Assemblierung (vgl. Kapitel 2.3.8.1 und 2.3.9.1) wurde der Deletionsvektor pKOS6b $\Delta$ sgdh::fdh erst in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen (vgl. Kapitel 2.3.6) und anschließend mittels Elektroporation (vgl. Kapitel 2.3.7) in *G. oxydans*  $\Delta$ mgdh::fdh transformiert. Der Nachweis der 2. homologen Rekombination bei Klonen, die das Vektorrückgrat ins Genom integriert hatten, erfolgte wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 2.3.8.1 und 2.3.8.2).

Zur Kontrolle der erstellten Mutante mit einer weiteren *fdh*-Genomintegration konnten die Primer p264-fdhSCL.strep-F/R nicht verwendet werden, da ein positives Fragment bereits durch die erste Integration generiert werden würde. Die Kolonie-PCR (vgl. Kapitel 2.3.2.2) erfolgte daher mit Hilfe der Primer up-gox2015.F/p264-fdh.sgdh.R, die oberhalb des deletierten Gens *gox2015* und hinter dem integrierten *fdhSCL*-Gencluster binden konnten. Es konnte dabei nur dann ein Fragment amplifiziert werden, wenn *fdhSCL* genau an der Stelle des Gens *gox2015* integriert wurde.

## **2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1 Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins Inv1417**

Die heterologe Proteinproduktion wurde durch *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK5-*inv1417* in 500 ml LB-Medium mit 500  $\mu$ g/ml Ampicillin durchgeführt. Nach einer 1 %igen Inokulation aus einer Übernachtskultur, wurden die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,4 kultiviert und anschließend mit 25  $\mu$ l Anhydrotetracyclin (2 mg/ml) induziert. Die Produktion des rekombinanten Proteins Inv1417 erfolgte über Nacht bei 16 °C und 180 rpm. Am Folgetag wurden die Zellen durch einen 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm und 4 °C pelletiert und in 5 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) resuspendiert. Zusätzlich wurden 5  $\mu$ l Protease-Inhibitor-Cocktail

(Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt. Die Zellyse erfolgte mittels Ultraschall (Branson Sonifier Cell Disruptor und Branson Ultra Sonics Konverter, Danbury, USA), in einem Zeitintervall von 20 min mit einer Amplitude von 50 %. Das heterolog produzierte Protein wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min in den Überstand separiert.

Die Aufreinigung von Inv1417 aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe einer Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Dabei bindet das an die Invertase N-terminal fusionierte Strep-Tag, ein künstliches Oligopeptid mit der Aminosäuresequenz WSHQFEK, an immobilisiertes Strep-Tactin (IBA GmbH, Göttingen, Germany), während Verunreinigungen nicht gebunden und entfernt wurden. Die Aufreinigung erfolgte bei 4 °C mit gekühlten Puffern. Zum Abtrennen unspezifisch an die Säulenmatrix gebundener Proteine wurde Puffer W (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8) als Waschpuffer eingesetzt. Die Elution von Inv1417 erfolgte durch Zugabe von 2,5 mM Desthbiotin (zu Puffer W). Eine anschließenden Regeneration der Säule erfolgte nach Herstellervorschrift durch Einsatz von Puffer R (Puffer W + HABA). Das aufgereinigte Enzym wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit für ein SDS-Page Gel, einen Westernblot sowie zur Ermittlung der kinetischen Eigenschaften und des Substratspektrums verwendet.

#### **2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)**

Die verwendete Methode zur Proteinbestimmung basierte auf einer Komplexbildung zwischen dem Protein und dem Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant Blue G-250. Dieser kann bei niedrigen pH-Werten Komplexverbindungen mit hydrophoben und kationischen Seitenketten von Proteinen eingehen, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm entsteht. Da die Intensität der Absorption proportional zur Menge unpolarer und kationischer Seitenketten ist, kann die Proteinkonzentration darüber bestimmt werden.

Für die Proteinbestimmung wurde 20 µl aufgereinigtes Protein oder Zellsuspension mit 980 µl eines 1:5 verdünnten Bradford-Reagenzes versetzt und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Änderung der Absorption bei 595 nm wurde in 1 ml Kunststoffküvetten mittels Photometer (Helios-Epsilon der Firma Thermo Scientific, Waltman, USA) bei 595nm gegen einen Leerwert bestimmt. Für die Ermittlung der Konzentration des aufgereinigten Enzyms Inv1417 wurde Puffer E als Leerwert verwendet, für alle FDH-Analysen an ganzen Zellen der jeweilig verwendete Kaliumphosphat-Puffer.

Um die Proteinkonzentration über die gemessene Absorption ermitteln zu können, musste eine Kalibriergerade mit verschiedenen Konzentrationen erstellt werden. Dafür wurden Rinderserumalbumin-Standards (BSA) in den Konzentrationen 0-, 250-, 500-, 750- und 1 mg/ml erstellt und 20 µl des jeweiligen Standards wie zuvor mit 980 µl des 1:5 verdünnten Bradford-Reagenzes versetzt und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Auftragung der Absorptionswerte dieser Standards gegen die korrespondierende BSA-Konzentration in mg/ml,

konnte eine Geradengleichung erstellt werden, über die die Proteinkonzentration der Probe errechnet werden konnte.

### 2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Inv1417 wurde durch eine SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Laemmli (1976) untersucht. Die Methode erlaubt eine Auftrennung linearisierter und denaturierter Proteine anhand des Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld. Dabei weisen kleine Proteine grundsätzlich eine höhere Laufgeschwindigkeit auf als große Proteine. Um letztlich über ein SDS-Gel das Molekulargewicht bestimmen zu können, ist das Mitführen eines Markers mit bekannten Proteingrößen notwendig.

Das für die diskontinuierliche SDS-PAGE verwendete Gel bestand aus zwei Schichten mit unterschiedlichen Eigenschaften und verschiedenen Acrylamidanteilen. Das Sammelgel wies eine Konzentration von 5 % Acrylamid auf und diente der Aufkonzentrierung der Proben. Im Trenngel lagen 12,5 % Acrylamid vor, weshalb die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in diesem Teil des Gels erfolgte. Weitere Bestandteile waren Ammoniumpersulfat (APS), als Polymerisationsinitiator der Gelbildung sowie TEMED. Die Zugabe von TEMED als Katalysator der Polymerisationsreaktion erfolgte erst nach vollständigem Zusammenführen aller Komponenten des Gels. Der Trenngelpuffer (100 ml, pH 8,8) bestand aus 22,7 g Tris, für den Sammelgelpuffer (100 ml, pH 6,8) wurden 7,57 g Tris verwendet.

#### Zusammensetzung Trenngel (12,5 %)

---

Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	2 ml
Trenngelpuffer	1,2 ml
0,5 % SDS-Lösung	1,2 ml
dH <sub>2</sub> O	1,6 ml
TEMED	5 µl
10 % APS-Lösung	30 µl

#### Zusammensetzung Sammelgel (5 %)

---

Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	250 µl
Sammelgelpuffer	400 µl
0,5 % SDS-Lösung	400 µl
dH <sub>2</sub> O	950 µl
TEMED	5 µl
10 % APS-Lösung	30 µl

Vor Beladen des Gels wurden alle Proben mit Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert, wodurch die native Struktur der Proteine aufgehoben und eine Linearisierung der Proteine erzielt wurde. Als Marker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder der Firma

Thermo Fischer Scientific (Schwerte, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in speziellen Gelkammern (Bio-Rad, München, Deutschland). Das Gel wurde mit 1x Elektrodenpuffer überschichtet und der Lauf durch das Sammelgel unter einer Spannung von 60 V, die Auftrennung durch das Trenngel mit einer erhöhten Spannung von 90 V durchgeführt.

#### **1x Elektrodenpuffer (pH 8,3)**

Tris	3,0 g
Glycerin	14,4 g
SDS	1,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### **Zusammensetzung des Ladepuffers**

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

Die anschließende Visualisierung von Inv1417 im SDS-Gel erfolgte durch eine Silberfärbung (Blum et al. 1987). Durch eine Anlagerung von Silberionen an das Protein und eine anschließende Reduktion der Ionen zu elementarem Silber konnte das Protein als bräunliche Bande im Gel sichtbar gemacht werden. Die Silberfärbung wies eine sehr hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von etwa 0,1 bis 1 ng auf.

Die Durchführung der Färbung begann mit einem 20-minütigen Inkubationsschritt des SDS-Gels in Fixierlösung, wodurch Proteine denaturiert und im Gel fixiert wurden. Anschließend wurde das Gel für 10 min in 50 %iges Methanol überführt und dann für weitere 10 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Im nächsten Schritt wurden freie, nicht durch Proteine besetzte Stellen im Gel, durch einen 1-minütigen Inkubationsschritt in einer Thiosulfatlösung maskieren und damit die Sensitivität der Färbung erhöht. Nach zwei weiteren Wachsritten erfolgte eine Imprägnierung des Gels für 20 min unter Lichtausschluss bei 4 °C. Dabei fand die Anlagerung der Silberionen an die negative geladenen Seitenketten des Proteins statt. Die Reduktion zu elementarem Silber erfolgte durch Überführen des Gels in Entwicklerlösung und das darin befindliche Formaldehyd. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Gel mit Stopplösung überschichtet.

#### **Zusammensetzung der Fixierlösung**

Methanol	500 ml
Essigsäure	120 ml
37 %iges Formaldehyd	0,5 ml
rH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### **Thiosulfatlösung (0,02 %)**

---

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	500 ml
rH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

### **Imprägnierlösung**

---

AgNO <sub>3</sub>	0,1 g
37 %iges Formaldehyd	0,037 ml
rH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

### **Entwicklerlösung**

---

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,1 g
37 %iges Formaldehyd	0,037 ml
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,004 g
rH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

### **Stopplösung**

---

Eisessig	2,5 ml
rH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

#### **2.4.4 Nachweis von Inv1417 mittels Westernblot**

Die verwendete Methode des Westernblots nach Towbin et al. (1979) diente dem indirekten Nachweis von Inv1417 durch Detektion des N-terminal fusionierte Strep-Tags mit einem Strep-Tactin® HRP Konjugat (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland).

Zuerst musste das Protein aus dem SDS-Gel im Mini-Semidry-Blot (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) auf eine Nitrozellulosemembran (4,5 µM, Bio-Rad, München, Deutschland) durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 15 V transferiert werden. Dafür wurden Gel, Whatmanpapier und die Nitrocellulosemembran in Towbin-Puffer getränkt und luftblasenfrei zusammengesetzt. Nach drei Schichten Whatmanpapier, folgte die Nitrocellulosemembran, das Gel und schließlich drei weitere Schichten Whatmanpapier.

#### **Towbin-Puffer (pH 8,3, nicht titrieren)**

---

Tris	1,52 g
Glycin	7,2 g
Methanol	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Nach Proteintransfer wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung (5 % w/v Milchpulver in PBS-Puffer) inkubiert, wodurch freie Bindungsstellen gesättigt wurden. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in jeweils 20 ml PBS-Tween-Puffer (0,1 % v/v Tween in PBS-Puffer) gewaschen

und für 1 h mit einem Meerrettich Peroxidase-gekoppelten Strep-Tactin-Konjugat (IBA, Göttingen) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS-Puffer erfolgte die Detektion des Proteins über das fusionierte Strep-Tag durch Zugabe von 200 µl Chloronaphthol-Lösung (3 % w/v 4-Chloro-1-naphthol in Methanol) sowie 20 µl einer Wasserstoffperoxid-Lösung (30 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nach einer Inkubation im Dunkeln. Durch das Chromogen 4-Chloro-1-naphthol und Wasserstoffperoxid entstand mithilfe der Peroxidase das farbige Oxidationsprodukt 4-Chloro-1-naphthon, was eine Visualisierung des Proteins durch die Farbreaktion ermöglichte.

#### **PBS-Puffer (pH 7,4)**

---

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
NH <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	ad 1000 ml

## **2.5 Nachweis von Enzymaktivitäten**

### **2.5.1 Zellfraktionierung zur Lokalisation der heterolog produzierten Invertase**

Die Präparation der Zellfraktionen Cytoplasma, Periplasma sowie des extrazellulären Raums wurde nach der Arbeit von Tsukada und Perlman (1972), mit Modifizierungen nach Kosciow et al. (2014) durchgeführt. Dadurch sollte die Lokalisation sowie die Aktivitätsverteilung von Inv1417 innerhalb der Kompartimente analysiert werden.

Für diesen Vorgang wurde eine Hauptkultur von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  in einem Volumen von 500 ml angelegt und bis zur spät exponentiellen Phase kultiviert. Dieser Zeitpunkt wurde mit Hilfe einer Wachstumskurve über die optische Dichte bestimmt. Die Kultur wurde anschließend für 20 min bei RT und 8000 rpm pelletiert. Der Kulturüberstand, der den extrazellulären Raum darstellte, wurde entnommen und musste nicht weiter aufgearbeitet werden. Nach einem Waschschriff erfolgte die Fraktionierung des Periplasmas durch einen osmotische Schock mit spezifischen Puffer. Dafür wurde das Zellpellet für 20 min in 25 mM Tris-HCl-Puffer mit 0,5 mM EDTA und 20 % Saccharose bei pH 6,8 resuspendiert. Durch Modifikation nach Kosciow et al. (2014) enthielt der Puffer zusätzlich 0.5 % Triton X-100, um die Lyse der äußeren Membran und die Freisetzung der periplasmatischen Fraktion zu verbessern. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in einer 50 ml eiskalten 5 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, die zusätzlich 6,25 µg pro ml Polymyxin B zur Zellmembran-Lyse enthielt, resuspendiert. Anschließend erfolgte erst ein 20-minütiger Inkubationsschritt auf Eis und dann eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm für 30 min. Die Periplasmafraktion der Zellen lag danach im Überstand vor. Die Cytoplasmafraktion wurden mittels Ultraschall freigesetzt und durch Zentrifugation von Zellresten befreit.

Die Messung der Enzymaktivität der Invertase1417 in den verschiedenen Zellfraktionen erfolgte in einem Volumen von 1 ml, bestehend aus 100 mM Phosphatpuffer (pH 6.5) und 1 M Saccharose.

Die Reaktion wurden durch Zugabe von 200 µl der untersuchten Fraktion gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden aus diesem Ansatz Proben gewonnen und mittels HPLC quantifiziert (vgl. Kapitel 2.7).

### 2.5.2 Enzymatische Reinheitskontrolle nach Zellfraktionierung

Die Kontrolle der Fraktionierung der Zellkompartimente von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  erfolgte durch Messung der Aktivität der nativ cytoplasmatischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Gox0145). Die Aktivität wurde photometrisch mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Germany) in den einzelnen Zellfraktionen über die Absorptionsänderung von NADP<sup>+</sup>/NADPH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Software Spectra Manager III (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland).

#### Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Test

NADP <sup>+</sup> (25 mM)	10 µl
Glukose-6-Phosphat	5 µl
Zellfraktion	10 µl
Tris-HCl-Puffer pH 7,5 (50 mM)	ad 1 ml

### 2.5.3 Substratspektrum von Inv1417

Die Analyse geeigneter Substrate für eine Umsetzung durch die Invertase aus *G. japonicus* LMG 1417 erfolgte enzymatisch in einem Reaktionsvolumen von 1 ml über einen Zeitraum von 24 h bei 30 °C. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Reaktion der Invertase mit 96 % [v/v] Ethanol (1:6 verdünnt) abgestoppt. Als mögliche Substrate wurden neben Saccharose auch Raffinose, Levanbiose, Levantriose, 1-Kestose, Melezitose, Turanose, Maltulose, Laktulose und Palatinose analysiert. Zusätzlich wurden auch die Polyfruktane Levan und Inulin eingesetzt. Eine erfolgreiche Hydrolyse des jeweiligen Substrats konnte über die resultierenden Fruktoseeinheiten visualisiert werden. Die Analyse erfolgte an der HPLC bei einer Säulentemperatur von 15 °C mit einer Flussrate von 0.6 ml pro min (vgl. Kapitel 2.7).

#### Substratspektrum Inv1417

Invertase 1417 (aufgereinigt)	1 µg
Substrat	50 mM
MES-Puffer pH 6,5	50 mM
rH <sub>2</sub> O	ad 1 ml

## 2.5.4 Charakterisierung von Inv1417

### 2.5.4.1 Ermittlung des pH- und Temperatur-Optimums

Die Bestimmung der optimalen Parameter erfolgte enzymatisch mit aufgereinigter Invertase bei verschiedenen Temperaturen bzw. pH-Werten. Die Ermittlung des pH-Spektrums erfolgte angepasst an einen späteren Produktionsprozess bei einer festen Temperatur von 30 °C. Der eingesetzte Puffer variierte zwischen pH 3 bis pH 8. Aufgrund dieses breiten pH-Bereichs wurde ein Kaliumphosphat basierter Puffer (KPP) eingesetzt. Die sauren pH-Bereiche wurden zusätzlich mit Phosphorsäure titriert. Für jeden pH-Wert wurde ein einzelner Reaktionsansatz angelegt und für 5 min bei 30 °C im Thermoblock inkubiert. Die Reaktion der Invertase wurde durch Zugabe von 96 %igen [v/v] Ethanol (1:6 verdünnt) abgestoppt und mittels HPLC analysiert (vgl. Kapitel 2.7).

#### pH-Optimum Inv1417

Invertase 1417 (aufgereinigt)	1 µg
Saccharose	50 mM
KPP, pH 3 - pH 8	50 mM
rH <sub>2</sub> O	ad 1 ml

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der verwendete Puffer im Enzymassay mit dem für die Invertase optimale pH-Wert von 5 eingesetzt. Der pH-Wert des Puffers blieb für jede Probe gleich, während die Reaktionstemperatur zwischen 30 °C und 80 °C variierte. Der Reaktionsansatz setzte sich wie zuvor bei der Ermittlung des pH-Spektrums zusammen. Auch das Abstoppen der Reaktion und die Analyse mittels HPLC erfolgten unter gleichen Bedingungen. Die Hitzebeständigkeit des Enzyms bei dem ermittelten Temperaturoptimum sowie bei einer an den späteren Produktionsprozess angepassten Temperatur von 30 °C, wurde anschließend in einen weiteren Reaktionsansatz bestimmt.

#### Temperatur-Optimum Inv1417

Invertase 1417 (aufgereinigt)	1 µg
Saccharose	50 mM
KPP, pH 5	50 mM
rH <sub>2</sub> O	ad 1 ml

### 2.5.4.2 Bestimmung der kinetischen Parameter $K_M$ und $V_{max}$

Durch eine nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten wurden, unter den optimalen Bedingungen von 60 °C und einem pH- Wert von 5, die kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  bestimmt. Die Ermittlung der spezifischen Aktivität erfolgte außerdem bei einer an den Produktionsprozess angepassten Temperatur von 30 °C, um einen Anhaltspunkt für die erwarteten Aktivitäten von Inv1417 unter Produktionsbedingungen zu erhalten.

Zur Bestimmung der Enzymparameter wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik für das Substrat Saccharose aufgezeichnet, indem die spezifische Aktivität von Inv1417 bei variierenden Saccharosekonzentrationen (zwischen 5  $\mu$ M und 1,5 M) und gleichbleibender Enzymmenge, bestimmt wurde. Die nicht-lineare Regression der so ermittelten Daten und die Berechnung der zugrundeliegenden Parameter erfolgte mittels GraphPad Prism 8.

### 2.5.5 Bestimmung der Fruktose-Dehydrogenase Aktivität

In allen untersuchten *Gluconobacter*-Stämmen mit chromosomalem oder Plasmid-kodiertem *fdhSCL*-Gencluster, wurde die Aktivität der FDH an ganzen Zellen ermittelt. Dafür wurden 2 ml einer Übernacht-Kultur für 5 min bei 8000 rpm pelletiert, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) gewaschen und anschließend in 1 ml resuspendiert. Die FDH-Aktivität wurde mit diesem Zellextrakt unter Verwendung Fruktose als Substrat ermittelt, wobei Dichlorophenolindophenol (DCPIP, Endakzeptor) und Phenazin Methosulfat (PMS, intermediärer Elektronenakzeptor) als artifizielle Elektronenakzeptoren dienten (Zeiser et al. 2014). Der Test erfolgte photometrisch, mit einem Jasco V600 Spektrophotometer (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland), bei einer Temperatur von 30 °C und einem pH-Wert von 7. Um während der Enzymreaktion eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurde ein Jasco ETC-717-Thermostat (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) verwendet. Das Absorptionsverhalten von DCPIP war abhängig vom pH-Wert. Die Reduktion von DCPIP wurde in diesem Versuch bei einem pH 7 durch die Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Der spezifische Extinktionskoeffizient bei pH 7 lag bei 21,0  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Armstrong 1964; Hölscher et al. 2007). PMS als intermediärer Elektronenakzeptor wurde im Gegensatz zu DCPIP nicht verändert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Spectra Manager™ III Software (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland).

#### Fruktose-Dehydrogenase Test

---

Zellen	10 $\mu$ l
Fruktose	20 mM
DCPIP	0,15 mM
PMS	0,65 mM
KPP, pH 7	50 mM
rH <sub>2</sub> O	ad 1 ml

Die Volumenaktivität (U/ml) innerhalb eines Reaktionsansatzes wurde nach Lambert-Beer berechnet (Formel 1). Die Ermittlung der FDH-Aktivität in den jeweiligen Stämmen erfolgte aus der Volumenaktivität, geteilt durch die eingesetzte Proteinkonzentration (mg/ml). Eine Unit (U) FDH-Aktivität entsprach demnach der Oxidation von 1.0  $\mu$ mol Fruktose pro min pro mg Gesamtprotein.

**Formel 1:** Berechnung der Volumenaktivität (U/ml).  $\Delta E \text{ min}^{-1}$  entspricht der Absorptionsänderung pro , V dem Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes (ml), d der Schichtdicke der Küvette (cm),  $\epsilon$  dem Extinktionskoeffizienten ( $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) von DCPIP bei pH 7 und v dem Volumen der Enzymlösung (ml).

$$U/\text{ml} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} * V}{d * \epsilon * v}$$

## 2.6 Versuche zur 5-KF-Produktion

Die Synthese von 5-KF erfolgte in dieser Arbeit aus den Substraten Fruktose oder Saccharose, in einem Volumen von maximal 100 ml. Um einer Sauerstofflimitierung entgegenzuwirken, wurden alle Kultivierungen in Schikanekolben durchgeführt.

### 2.6.1 Produktion von 5-KF ausgehend von Fruktose

Die Oxidation von Fruktose zu 5-KF wurde in den Stämmen *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$ , *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  und *G. oxydans* *fdh* analysiert und zur Bestimmung des geeignetsten Produktionsstammes miteinander verglichen. Die Kultivierungen erfolgten in 100 ml YF-Medium, bestehend aus 100-120 mM Fruktose, 6 g/L Hefeextrakt und 100 mM MES-Puffer (pH 6,5). Alle Ansätze enthielten Cefoxitin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie im Fall von *G. oxydans* *fdh* zum Erhalt der Plasmidstabilität zusätzlich Kanamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Inokulation erfolgte aus einer 24 stündigen Vorkultur mit einer finalen optischen Dichte von 0,03-0,05. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 180 rpm für mindestens 48 h. Die genaue Dauer und die Konzentration des Substrats können dem jeweiligen Versuch entnommen werden. Das Wachstum der Stämme und die zugehörigen Wachstumsparameter wurden wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, bestimmt. Die Analyse der Menge an gebildeter 5-KF und der dazu benötigten Produktionszeit erfolgte mittels HPLC (vgl. Kapitel 2.7).

### 2.6.2 Einsatz hoher Fruktosemengen zur Steigerung der 5-KF-Ausbeute

Zur Anpassung an industrielle Maßstäbe sollte die Produktmenge bei einer antibiotikafreien Kultivierung von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  durch Einsatz höherer Substratkonzentrationen (Fruktose) optimiert werden. Um die maximal einsetzbare Fruktosekonzentration für eine Kultivierung im Schüttelkolben-Maßstab zu ermitteln, bei der keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum detektierbar waren, wurden verschiedene Mengen des Substrats eingesetzt. Das verwendete YF-Medium bestand aus 6 g/L Hefeextrakt, 100 mM MES-Puffer (pH 6,8) und 100-500 mM Fruktose. Zum Schutz gegen osmotischen Stress, wurden jedem Ansatz 3 mM Mannitol zugefügt. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung in einem 500 ml Schikanekolben mit einem Arbeitsvolumen von maximal 100 ml. Die Auswirkung der hohen Fruktosekonzentrationen auf das Wachstum wurde über die optische Dichte bestimmt sowie Wachstumsrate und Verdopplungszeit daraus ermittelt (vgl. Kapitel 2.2.4).

Die 5-KF-Produktion erfolgte schließlich mit einer anfänglichen Fruktosekonzentration von 400 mM in einem Volumen von 70 ml. Das Medium wurde in den sonstigen Bestandteilen nicht verändert. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 180 rpm für 169 h. Die Analyse der Produktkonzentration und die Ermittlung verbleibender Fruktose erfolgte mittels HPLC (vgl. Kapitel 2.7). Nach vollständiger Umsetzung von 400 mM Fruktose, wurden der Kultur durch einen Zufütterungsschritt weitere 400 mM Fruktose, 3 mM Mannitol sowie 50 mM MES (pH 6,8) zugefügt. Um ein zu starkes Absinken des pH-Wertes während der Kultivierung zu verhindern, wurde dieser regelmäßig überprüft und bei Bedarf durch Zugabe weiteren MES-Puffers (pH 6,8) reguliert.

### **2.6.3 Synthese von 5-KF aus dem Substrat Saccharose**

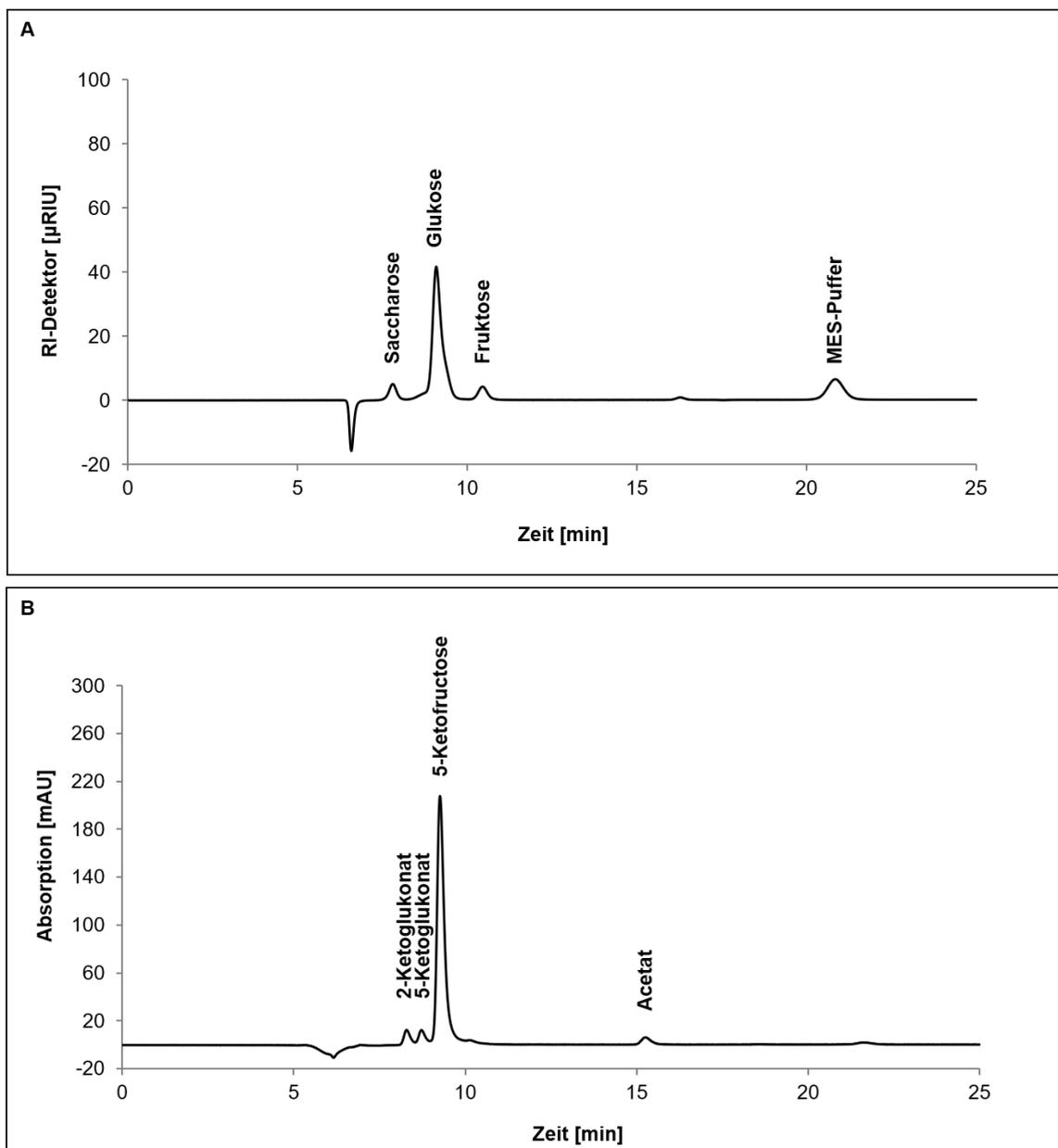
Die Effizienzen der Expressionsstämme *G. japonicus* LMG 26773, *G. japonicus* LMG 26773 *fdh*, *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv*, *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* $\Delta$ *sgdh::fdh inv* sowie *G. japonicus* LMG 1281 *inv* wurden durch Wachstumsversuche mit dem Substrat Saccharose bestimmt. Dafür wurden Hauptkulturen in einem Volumen von 50-100 ml YS-Medium, bestehend aus 100-120 mM Saccharose, 6 g/L Hefeextrakt, 50-100 mM MES-Puffer (pH 6,5) und Cefoxitin (50 µg/ml) angelegt. Zusätzlich wurde 50 µg/ml Kanamycin zur Aufrechterhaltung der Plasmidstabilität zugefügt (Kulturen von *G. japonicus* LMG 26773 wurden ohne Kanamycin kultiviert). Die Inokulation dieser Hauptkulturen erfolgte aus einer 24- bzw. 48-stündigen Vorkultur mit einer finalen optischen Dichte von 0,03-0,05. Die Kultivierung wurde bei 30 °C und 180 rpm für mindestens 48 h durchgeführt. Dem jeweiligen Versuch sind die genaue Kultivierungsdauer und die Substratkonzentration zu entnehmen. Der Substratverbrauch und die Bildung des Produktes 5-KF wurden mittels HPLC analysiert (vgl. Kapitel 2.7). Zudem wurde auch das Wachstum anhand der optischen Dichte ermittelt und daraus die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit berechnet (vgl. Kapitel 2.2.4).

## **2.7 Analytischer Nachweis von Substratverwertung und Produktbildung mittels HPLC**

Die Analyse aller Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte mittels HPLC mit einer Aminex HPX-87H Säule (BioRad, Munich, Germany, 300 mm × 7.8 mm) unter Verwendung von 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als mobile Phase. Die Probenvorbereitung der zu analysierenden Kulturüberstände erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 1 min. Der Überstand wurde anschließend 1:10 mit rH<sub>2</sub>O verdünnt und für die Messung an der HPLC eingesetzt.

Die Bestimmung der Konzentration des Substrats Saccharose sowie der resultierenden Glukose- und Fruktosemengen erfolgte bei 15 °C mit einer Flussrate von 0.6 ml pro min. Die Detektion dieser Zucker erfolgte über den Refractive Index Detektor (RI-Detektor) durch den Vergleich mit vorhandenen Kalibrierungskurven (Abb. 2 A). Zur Quantifizierung der Produkte 5-KF, 2-Ketoglukonat, 5-Ketoglukonat und Acetat wurde die Temperatur der Säule auf 65 °C erhöht, die Flussrate blieb gleich. Die Detektion erfolgte hierbei über den UV-Vis Detektor bei 210 nm (Abb. 2 B). Die Retentionszeiten der jeweiligen Substanzen können ebenfalls Abbildung 2 entnommen werden. Um die Levanproduktion von *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* zu prüfen, erfolgte die Probenverarbeitung wie zuvor beschrieben. Der Überstand wurde jedoch

1:5 mit 96 % [v/v] Ethanol versetzt, wodurch Levan ausgefällt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13000 rpm, wurde das entstandene Pellet zuerst mit 6 M HCl versetzt, dann bei 90 °C für 5 min hydrolysiert und nachfolgend mit NaOH neutralisiert. Alle Proben wurden für eine Analyse an der HPLC nochmals im Verhältnis 1:2 mit Wasser verdünnt. Die Levanproduktion konnte indirekt über die Menge an vorhandenen Fruktoseeinheiten quantifiziert werden.



**Abbildung 2:** Exemplarische Darstellung einer HPLC-Analyse zur Ermittlung der Substrat- und Produktkonzentrationen. A: Detektion von Saccharose, Fruktose und Glukose über den RI-Detektor bei einer Säulentemperatur von 15 °C mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. Die Retentionszeiten lagen bei 7,8 min für Saccharose, 9,08 min für Glukose und 10,45 min für Fruktose. B: Quantifizierung der Produkte bei einer Säulentemperatur von 65 °C. 2- und 5-Ketoglukonat konnten nach einer Retentionszeit von 8,3 bzw. 8,7 min detektiert werden. 5-KF war mittels UV-Vis-Detektor (210 nm) nach 9,3 min und Acetat bei einer Retentionszeit von 15,27 min nachweisbar.

### 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung und Optimierung eines industriell geeigneten Expressionsstammes zur Produktion des alternativen Süßstoffs 5-Ketofruktose aus dem kostengünstigen Substrat Saccharose. Die 5-KF-Synthese erfolgte bisher ausgehend von Fruktose, durch eine Plasmid-vermittelte heterologe Produktion der membrangebundenen Fruktose-Dehydrogenase (FDH) aus *G. japonicus* NBRC 3260 in *G. oxydans fdh* (Siemen et al. 2018). Um den Prozess erstmals auf das alternative Substrat Saccharose zu erweitern wurde ein Zwei-Stamm-System entwickelt (Siemen et al. 2018), das auf der Co-Kultivierung der Stämme *G. oxydans fdh* und *G. oxydans ΔtolB sacC* basierte (vgl. Kapitel 4.2, Abb. 62). Um die Funktionsweise dieses Systems zu erläutern, muss die Aufnahme und der Metabolismus von Saccharose in *G. oxydans* betrachtet werden. Der Wildtyp-Stamm besitzt keine spezifischen Transporter zur aktiven Aufnahme des Disaccharids in die Zelle (Prust et al. 2005), die Verbindung kann aber über Porine der äußeren Membran ins Periplasma gelangen (Kosciow 2017; Siemen et al. 2018). *G. oxydans* ist außerdem aufgrund fehlender Gene nicht natürlicherweise zur Spaltung von Saccharose befähigt (Prust et al. 2005; Kosciow 2017; Siemen et al. 2018). Die Hydrolyse des Substrats erfolgte daher im Zwei-Stamm-System durch Integration von *G. oxydans ΔtolB sacC* durch eine Plasmid-vermittelte heterologe Produktion der Sucrase SacC aus *Z. mobilis* (Kosciow 2017). Da für SacC im Wirtsorganismus kein bekanntes Signalpeptid nachgewiesen werden konnte (Preziosi et al. 1990; O'Mullan et al. 1992), wurde die notwendige periplasmatische Lokalisation des Enzyms in *G. oxydans ΔtolB sacC* durch Einbringen einer Signalsequenz der Pektatlyase B (PelB) aus *P. carotovora* (Kosciow 2017) sec-abhängig vermittelt. Die aus der Saccharosespaltung resultierenden Monosaccharide konnten über Porine der äußeren Membran in den extrazellulären Raum diffundieren. Fruktose wurde schließlich im Periplasma des zweiten Stammes, *G. oxydans fdh*, durch die heterolog produzierte FDH zu 5-KF oxidiert (Siemen et al. 2018). Eine detaillierte Beschreibung des Zwei-Stamm-Systems kann Kapitel 4.2 entnommen werden.

Obwohl dieses System eine erste Produktion von 5-KF aus dem Substrat Saccharose ermöglichte, wies es aufgrund der Co-Kultivierung zweier Stämme einige Nachteile auf und war noch nicht optimal für einen industriellen Einsatz geeignet. Lagen die Stämme beispielsweise in unterschiedlichen Wachstumsphasen vor, konnte dies einen Einfluss auf die Enzymaktivitäten und die Substratumsetzung haben, was sich negativ auf die Effizienz des Systems auswirkte. Um einen stabilen Produktionsprozess gewährleisten zu können, war daher die Etablierung eines Ein-Stamm-Systems mit hohen Enzymaktivitäten notwendig.

#### 3.1 Optimierung der Saccharosespaltung

Für die Entwicklung eines einzelnen Expressionsstammes, mit dem ausgehend aus dem Substrat Saccharose effizient 5-KF produziert werden kann, war im ersten Schritt die Gewährleistung einer schnellen und verlässlichen Saccharosespaltung notwendig. Das Vorliegen von Fruktose, als Grundbaustein für die 5-KF-Produktion, war in diesem System abhängig von der hydrolytischen

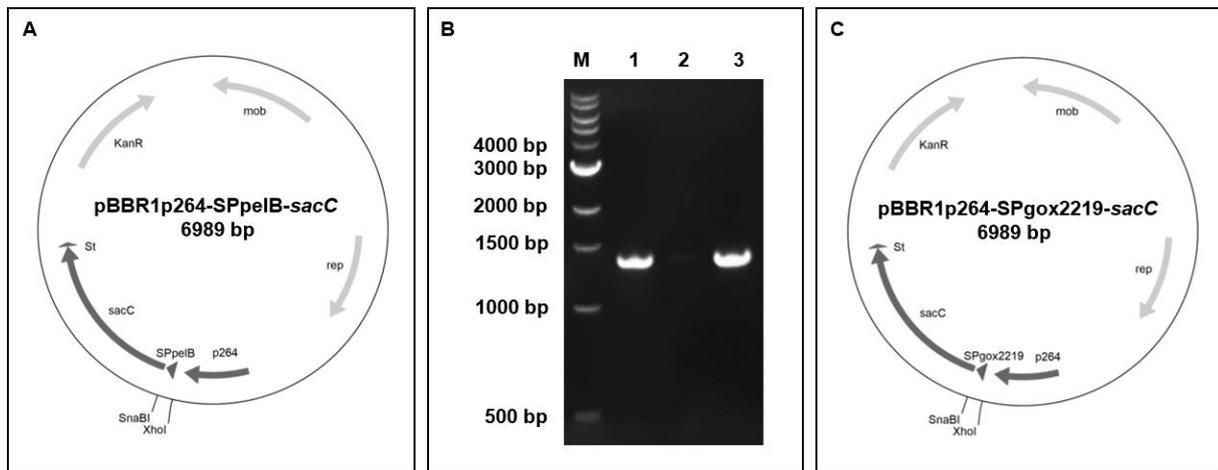
Aktivität des eingesetzten Saccharose-spaltenden Enzyms. Die bisher verwendete Exosucrase SacC wies im Ursprungsorganismus *Z. mobilis* eine spezifische Aktivität von 1800 U/mg Protein auf (O'Mullan et al. 1992). Das heterolog in *G. oxydans*  $\Delta tolB$  *sacC* produzierte Enzym erreichte hingegen nur einen Wert von  $11 \pm 1$  mU/mg Protein und war damit die limitierende Reaktion des Zwei-Stamm-Systems. Der Aktivitätsverlust ging vermutlich mit der eingefügten Signalsequenz von *pelB* einher (Kosciow 2017), durch die eine periplasmatische Lokalisation der Sucrase erreicht wurde (vgl. Kapitel 4.2). Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Einsatz dieses Signalpeptids zu einer unzureichenden Translokation der Sucrase über die Cytoplasmamembran führte. Für eine effizientere Saccharosespaltung war daher eine Optimierung dieses Enzyms notwendig. Dabei sollte sowohl eine Verbesserung der Aktivität als auch eine vollständige Translokation des Proteins ins Periplasma erzielt werden.

### 3.1.1 Optimierung der hydrolytischen Aktivität von SacC durch Austausch der Signalpeptide

Zur Steigerung der hydrolytischen Aktivität von SacC im Periplasma wurden weitere Signalpeptide getestet, die aus dem Produktionsorganismus *G. oxydans* selbst stammten. Da es sich um wirtseigene Sequenzen handelte, war davon auszugehen, dass diese bei der heterologen Proteinproduktion durch den Zielorganismus erkannt werden. Dennoch können Inkompatibilitäten zwischen dem Signalpeptid und dem Zielprotein vorliegen, weshalb die Effizienz der Sucrase mit den ausgewählten Signalsequenzen experimentell durch heterologe Produktion in *G. oxydans* geprüft werden musste. Insgesamt wurden fünf Signalpeptide aus einer *Gluconobacter*-spezifischen Bibliothek (Kosciow et al. 2014) ausgewählt. Dazu zählten die Sec-Transport-vermittelnden Signalsequenzen von Gox2219 (Ribose-ABC-Transporterbindeprotein), Gox0605 ( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase), Gox0748 (Aldose-1-Epimerase), Gox0854 (Sorbitol-Dehydrogenase, *sld*) und das Tat-Transport-vermittelnde Signalpeptid von Gox0187 (putative Disulfidisomerase).

Zur Erstellung des Expressionsvektors konnte das ursprüngliche Plasmid pBBR1p264-SP*pelB-sacC* (Kosciow 2017) verwendet werden, welches für die Sucrase SacC kodiert. Zudem konnte die eingefügte Signalsequenz *pelB* durch einen einfachen Klonierungsschritt über die Schnittstellen *XhoI* und *SnaBI* ausgetauscht werden (Abb. 3 A). Die gewünschten Signalsequenzen wurden durch die verwendeten Primer SPgox2219.fw/ SPgox2219.rev, SPgox0605.fw/ SPgox0605.rev, SPgox0748.fw/ SPgox0748.rev, SPgox0854.fw/ SPgox0854.rev und SPgox0187.fw/ SPgox0187.rev amplifiziert und dabei ebenfalls mit den Schnittstellen *XhoI* und *SnaBI* versehen. Die erstellten Konstrukte wurden anschließend mittels Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  und im nächsten Schritt über Elektroporation in *G. oxydans*  $\Delta tolB$  und *G. oxydans* eingebracht (Abb. 3 C, exemplarisch). Eine Kontrolle des Plasmids erfolgte mit Hilfe einer Kolonie-PCR durch Verwendung des forward-Primers der jeweiligen Signalsequenz und des revers-Primers von SacC. Das erwartete Fragment besaß eine Größe von 1380 bp. Mittels Gelelektrophorese konnte bestätigt werden, dass die Klonierung für alle Signalpeptid-Varianten erfolgreich war. Das Agarosegel zum Screening ist für *G. oxydans* pBBR1p264-SPgox2219-*sacC* exemplarisch

dargestellt (Abb. 3 B). Die Klone wiesen eine Bande von 1400 bp auf, was der erwarteten Fragmentgröße von 1380 bp entsprach.



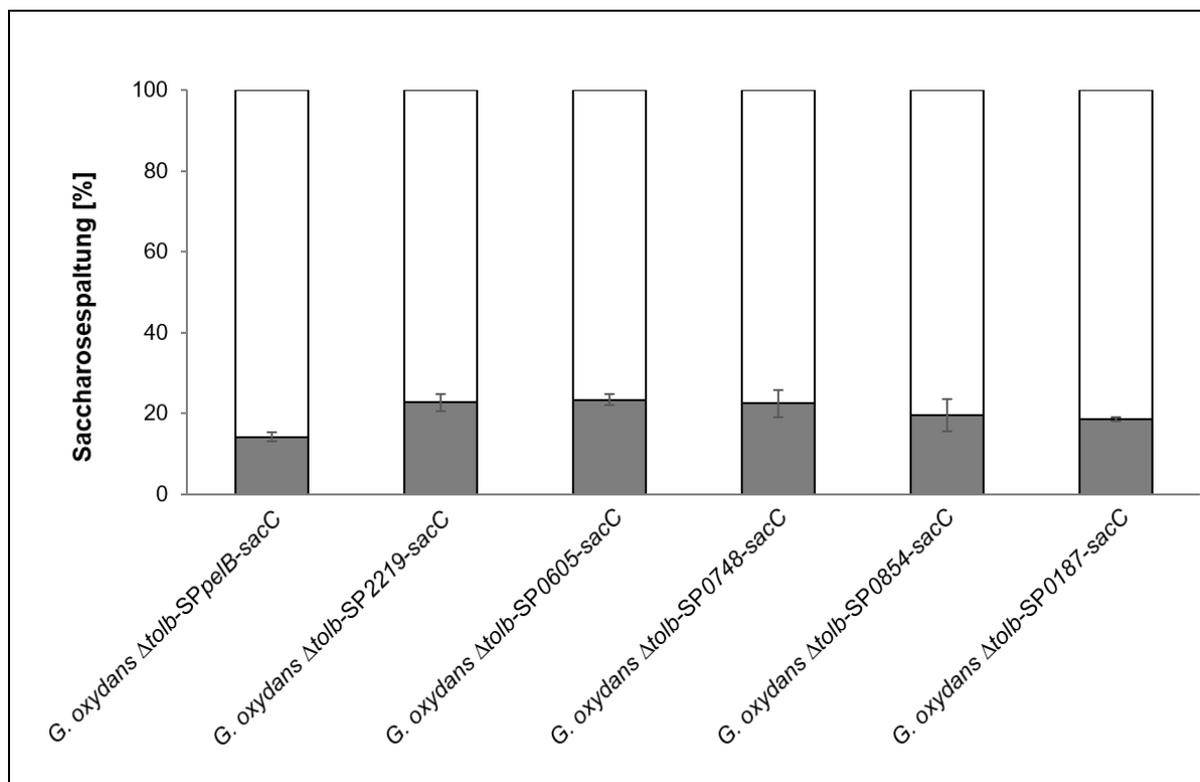
**Abbildung 3:** Klonierungsstrategie für den Einsatz verschiedener Signalpeptide vor SacC. A: Ausgangsplasmid pBBR1p264-SP*pelB*-*sacC* (Kosciow 2017). Nach Amplifizierung der jeweiligen Signalsequenz und Verdau über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SnaBI* wurde die Signalsequenz *pelB* ausgetauscht. B: Agarosegel nach Kolonie-PCR zur Überprüfung des Signalpeptidaustauschs. M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Lane 1-3: DNA-Fragmente nach der PCR. Die erwartete Fragmentgröße betrug 1380 bp. C: Plasmid mit ausgetauschter Signalsequenz, am Beispiel von pBBR1p264-SP*gox2219*-*sacC*.

### 3.1.1.1 Auswirkung verschiedener Signalpeptide auf die Effizienz von SacC in *G. oxydans* $\Delta$ *tolB*

Um den Effekt des Signalpeptidaustauschs auf die periplasmatische Saccharosespaltung und die hydrolytische Aktivität von SacC zu analysieren, wurden Kultivierungen aller erstellten Stämme in YS-Medium mit 100 mM Saccharose durchgeführt. Die Abnahme der Saccharosekonzentration wurde mittels HPLC detektiert. Die Analyse erfolgte zuerst im verwendeten Organismus des Zwei-Stamm-Systems, *G. oxydans*  $\Delta$ *tolB*, in dem eine Deletion des Gens *gox1687* (*tolB*) vorlag (Kosciow et al. 2016). Das Protein TolB gehört zu dem Tol-Pal-Komplex, der für die Integrität und Stabilität der äußeren Membran verantwortlich ist (Lazzaroni et al. 1999). Die Deletion von *gox1687* führte daher zu einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Membran (Kosciow et al. 2016). TolB stellt außerdem eines der häufigsten periplasmatischen Proteine vieler Organismen dar (Imperi et al. 2009; Lo Sciuto et al. 2014). Eine Deletion von *gox1687* konnte daher die Auslastung des Sec-vermittelten Transportmechanismus verringern (Kosciow et al. 2016), was im Fall des Zwei-Stamm-Systems in einer erhöhten Sekretion von SacC in den extrazellulären Raum resultierte (Kosciow et al. 2016, Siemen et al. 2018).

Die HPLC-Analyse der Kulturüberstände ergab, dass der Austausch der Signalsequenz von *pelB* gegen die eingesetzten *Gluconobacter*-spezifischen Signalpeptide nicht zu einer signifikanten Verbesserung der periplasmatischen Saccharosespaltung führte (Abb. 4). Der bisher im Zwei-Stamm-System verwendete Stamm *G. oxydans*  $\Delta$ *tolB* *sacC* konnte nach einer Kultivierungsdauer von 52 h lediglich 15 % der vorhandenen Saccharose im Periplasma spalten, was die beschriebene

geringe hydrolytische Aktivität des rekombinanten Enzyms (Kosciow 2017) bestätigte. Die finale optische Dichte lag bei OD 0,71. Unter Verwendung der Signalsequenzen der Proteine Gox2219, Gox0605, Gox0748, Gox0854 und Gox0187 konnte die Saccharosespaltung durch SacC in *G. oxydans*  $\Delta tolB$  bei vergleichbarer optischer Dichte geringfügig erhöht werden (Abb. 4). Mit einer hydrolytischen Effizienz von maximal 20 - 23 % reichte dies jedoch weiterhin nicht für einen optimierten Produktionsprozess aus.

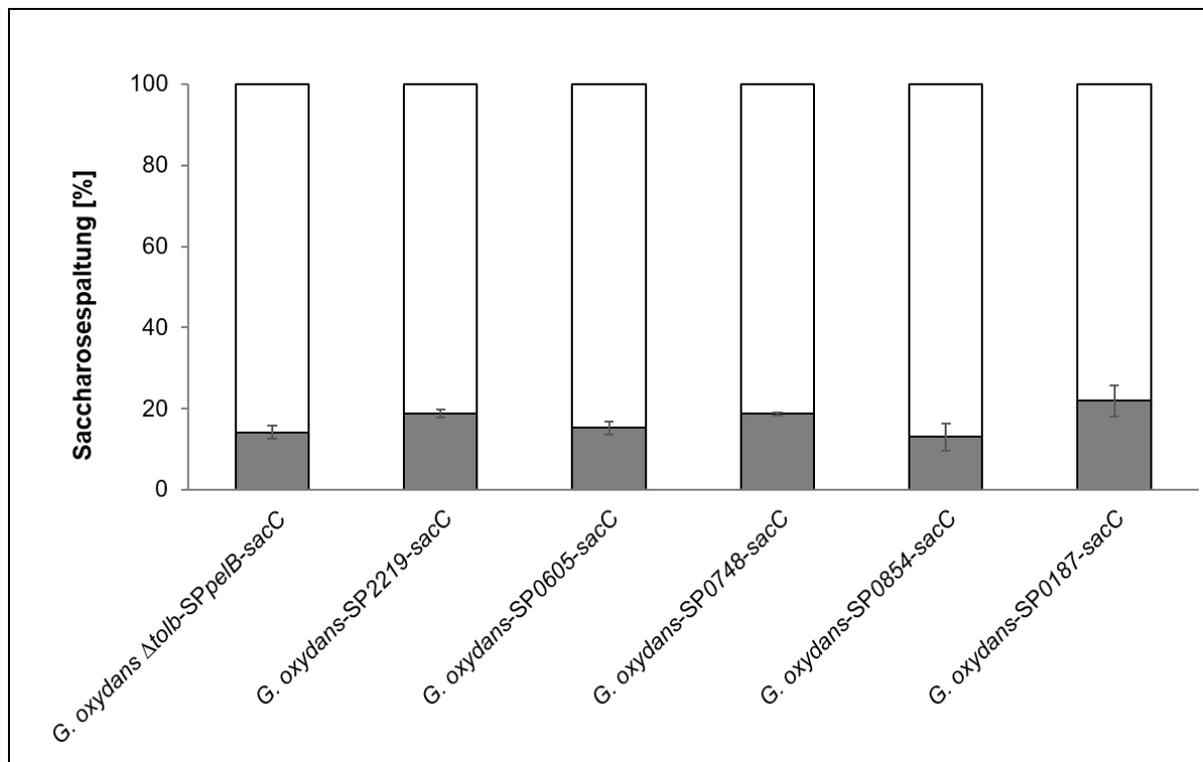


**Abbildung 4:** Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die periplasmatische Saccharosespaltung durch SacC in *G. oxydans*  $\Delta tolB$ . Alle Stämme wurden in YS-Medium mit 100 mM Saccharose bei 30 °C für 52 h kultiviert. Die Abnahme der Saccharosekonzentration wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt. Eine 100 %ige Spaltung von Saccharose ist definiert als vollständige Hydrolyse von 100 mM Saccharose. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt, die daraus ermittelten Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.1.1.2 Auswirkung verschiedener Signalpeptide auf die Effizienz von SacC in *G. oxydans*

Die TolB-Mutante führte im Zwei-Stamm-System zu einer erhöhten Sekretion von SacC in den extrazellulären Raum (Siemen et al. 2018), zeigte im direkten Vergleich zum Wildtyp *G. oxydans* jedoch eine leichte Reduktion der finalen Zelldichte und der initialen Wachstumsrate (Kosciow et al. 2016). Um auszuschließen, dass dies einen negativen Einfluss auf die Saccharosespaltung hatte, wurden alle erstellten Konstrukte mit den verschiedenen Signalsequenzen auch in *G. oxydans* eingebracht und wie zuvor getestet (vgl. Kapitel 3.1.1.1). Die Ergebnisse der HPLC-Analyse zeigten, dass auch die Verwendung des Wildtyp-Stammes nicht zu einer ausreichenden Erhöhung der Saccharosespaltung durch die heterolog produzierte Sucrase SacC führte (Abb. 5). Zwischen den verwendeten Stämmen *G. oxydans* und *G. oxydans*  $\Delta tolB$  waren vereinzelt geringe, aber dennoch nicht signifikante Unterschiede in der Effizienz zu erkennen. Beispielsweise konnten

20 - 23 % der vorhandenen Saccharose in Kultivierungen der Stämme *G. oxydans*  $\Delta tolB$ -SP0854-*sacC* und *G. oxydans*  $\Delta tolB$ -SP0605-*sacC* hydrolysiert werden (Abb. 4), während in Kulturüberständen von *G. oxydans*-SP0854-*sacC* und *G. oxydans*-SP0605-*sacC* eine Abnahme von nur 13 - 15 % nachgewiesen wurde (Abb. 5).



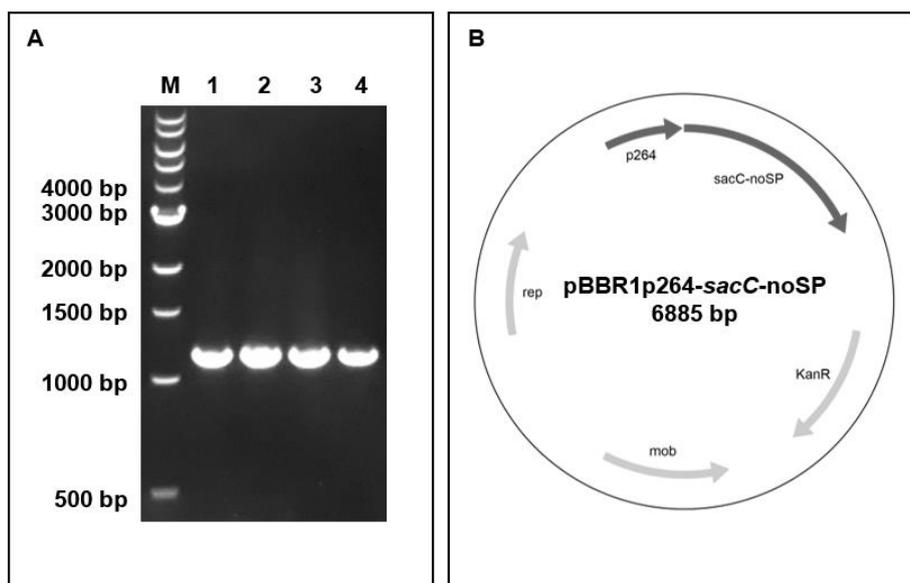
**Abbildung 5:** Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die periplasmatische Saccharosespaltung durch SacC in *G. oxydans*. Alle Stämme wurden in YS-Medium mit 100 mM Saccharose bei 30 °C für 52 h kultiviert. Die Abnahme der Saccharosekonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Eine 100 %ige Spaltung von Saccharose ist definiert als komplette Hydrolyse von 100 mM Saccharose. Das Experiment wurde dreifach wiederholt, die daraus ermittelten Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.1.1.3 Optimierung der periplasmatischen Saccharosespaltung durch SacC ohne zusätzlich eingefügte Signalsequenz

Die Ergebnisse der letzten Kapitel ließen vermuten, dass es sowohl durch den Einsatz von *Gluconobacter*-spezifischen Signalsequenzen als auch durch das Signalpeptid von PelB aus *P. carotovora*, zu einer unzureichenden Translokation von SacC ins Periplasma kam. Da für die Sucrase im Wirtsorganismus *Z. mobilis* kein bekanntes Signalpeptid identifiziert werden konnte, fand die Sekretion des Enzyms vermutlich über einen unbekanntes Transportweg statt (Preziosi et al. 1990). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die hydrolytische Aktivität von SacC in der nativen Form, ohne Zufügen eines Signalpeptids, ebenfalls untersucht.

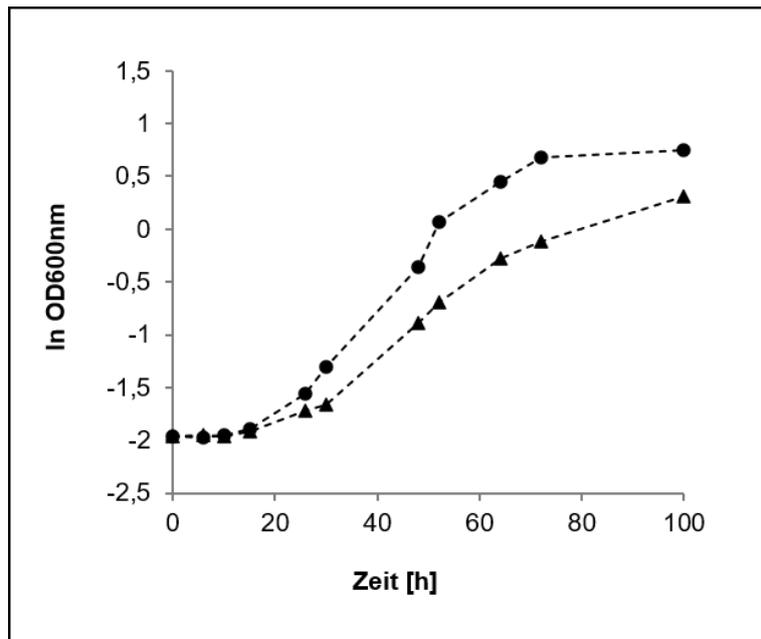
Zur Generierung eines geeigneten Expressionssystems wurde als Grundlage erneut der Vektor pBBR1p264 eingesetzt. Die Amplifizierung von *sacC* erfolgte unter Verwendung der Primer *sacC*-noSP-for und *sacC*-noSP-rev, wodurch die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* eingefügt wurden. Das erwartete Fragment besaß eine Größe von 1279 bp. Nach Restriktionsverdau von Vektor und

Amplifikat mit *EcoRI/HindIII* und anschließender Ligation, wurde das fertige Konstrukt (Abb. 6 B) in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (*E. coli* DH5 $\alpha$  pBBR1p264-*sacC*-noSP). Mittels Elektroporation konnte das Plasmid in *G. oxydans* eingebracht werden, wodurch der Stamm *G. oxydans* pBBR1p264-*sacC*-noSP (nachfolgend als *G. oxydans sacC*-noSP bezeichnet) entstand. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR konnte die korrekte Sequenz des eingefügten Amplifikats bestätigt werden. Die PCR-Fragmente aller geprüften Klone (Spur 1-4) wiesen im Agarosegel eine Größe von 1300 bp auf, was der erwarteten Größe von 1279 bp entsprach (Abb. 6 A).



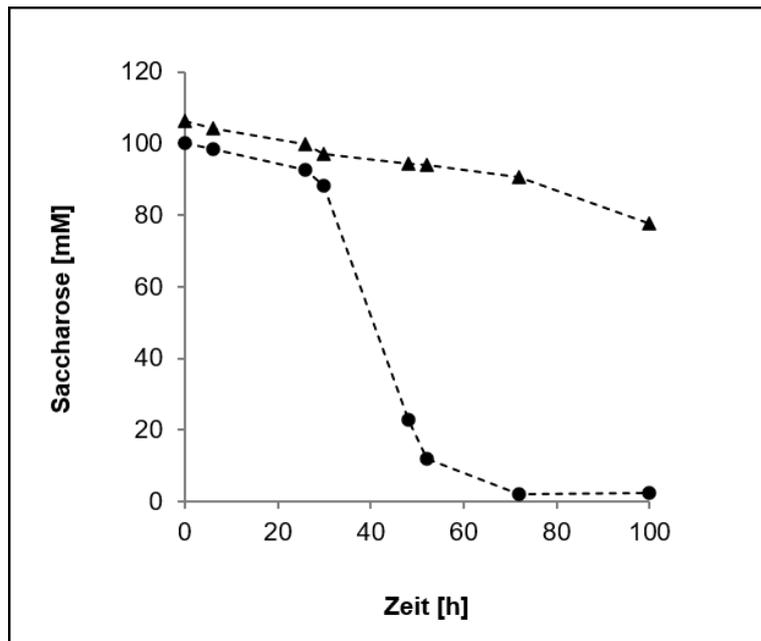
**Abbildung 6:** Kolonie-PCR und Plasmidkarte des erstellten Plasmids pBBR1p264-*sacC*-noSP. A: Agarosegel nach Kolonie-PCR beim Screening von *G. oxydans sacC*-noSP. M: 1 kb DNA-Ladder (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). 1-4: Amplifikat von vier exemplarischen Klone. Die Fragmente wiesen die erwartete Größe von 1279 bp auf. B: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pBBR1p264-*sacC*-noSP. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, rep: Replikationsursprung, p264: Promotorregion des Gens *gox0264*, mob: Mobilisierungsgen.

Die Analyse der Saccharosespaltung erfolgte durch Kultivierung von *G. oxydans sacC*-noSP in YS-Medium mit 100 mM Saccharose für 100 h bei 30 °C. Unter gleichen Bedingungen wurde zur Kontrolle *G. oxydans ΔtolB sacC* mitgeführt. Neben der Abnahme von Saccharose, die mittels HPLC detektiert wurde, erfolgte auch eine Analyse des Wachstums mit diesem Substrat. Beide Stämme konnten Saccharose als einzige C-Quelle nutzen (Abb. 7), zeigten aber verschiedene Wachstumsverläufe. Dies deutete darauf hin, dass auch in der Aktivität von SacC Unterschiede vorlagen. Zu Beginn des Wachstums wiesen beide Stämme bei Kultivierung auf Saccharose als einzigem Substrat lange lag-Phasen zwischen 15 und 26 h auf. Für *G. oxydans sacC*-noSP konnte eine finale OD<sub>600nm</sub> von 2,1 ermittelt werden, während *G. oxydans ΔtolB-SPpelB-sacC* nur einen Wert von 1,4 erreichte. Auch in den Wachstumsraten der exponentiellen Phase zeigten beiden Stämme deutliche Unterschiede. *G. oxydans sacC*-noSP wies eine Wachstumsrate von 0,05 h<sup>-1</sup> und eine Verdopplungszeit von 13 h auf, die Wachstumsrate von *G. oxydans ΔtolB sacC* verringerte sich hingegen auf 0,04 h<sup>-1</sup>. Die Verdopplungszeit lag entsprechend bei 17 h.



**Abbildung 7:** Wachstumsverhalten der Stämme *G. oxydans sacC-noSP* und *G. oxydans ΔtolB sacC* mit 100 mM Saccharose als C-Quelle. Dargestellt ist die logarithmische Zunahme der Zelldichte von *G. oxydans sacC-noSP* (●) und *G. oxydans ΔtolB sacC* (▲).

Anhand der HPLC-Daten konnte bestätigt werden, dass in beiden Stämmen deutliche Unterschiede in der Saccharosespaltung vorlagen (Abb. 8). Die Ergebnisse belegten außerdem, dass die hydrolytische Aktivität von SacC ohne ein zusätzlich eingefügtes Signalpeptid deutlich verbessert werden konnte. Eine Spaltung des Disaccharids konnte mit *G. oxydans sacC-noSP* nach 72 h abgeschlossen werden. Die Umsatzrate lag bei  $2,26 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . In Kultivierungen von *G. oxydans ΔtolB sacC* hingegen konnte im gleichen Zeitraum lediglich eine Abnahme von 27 mM Saccharose detektiert werden. Die Umsatzrate verlangsamte sich entsprechend auf  $0,35 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Obwohl SacC ohne zugefügtes Signalpeptid eine verbesserte hydrolytische Aktivität aufwies, lag in *G. oxydans sacC-noSP* in den ersten 26 h des Experiments (mit einer Umsatzrate von  $0,47 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) noch keine ausreichend effiziente Saccharosespaltung für einen industriellen Prozess vor (Abb. 8). Um lange lag-Phasen zu verhindern und eine stabile Produktion zu gewährleisten, war jedoch bereits zu Beginn der Kultivierung eine schnelle Hydrolyse des Substrats notwendig, da die resultierenden Monosaccharide die Grundlage für den Aufbau von Biomasse und die 5-KF-Synthese darstellten. Die Ergebnisse der Untersuchungen an SacC im Rahmen dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass die in *Z. mobilis* ermittelte hohe Aktivität des Enzyms nicht durch eine heterologe Produktion in *G. oxydans* erzielt werden konnte.

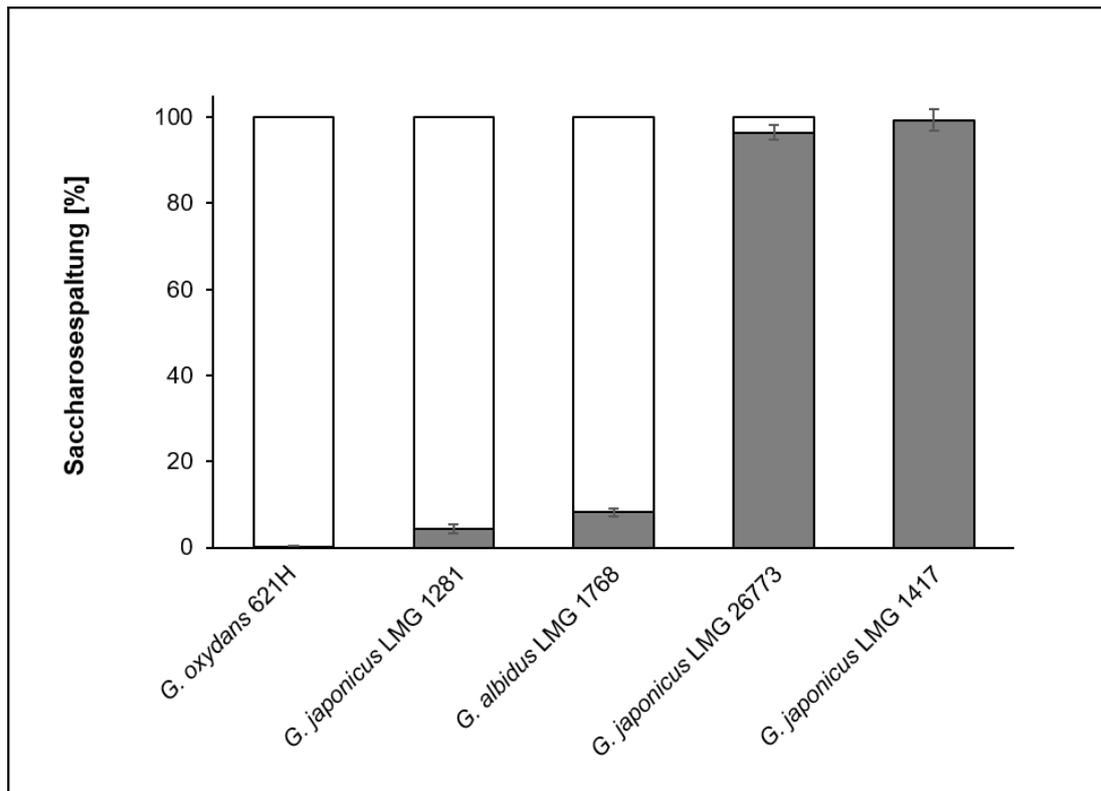


**Abbildung 8:** Saccharosespaltung durch *G. oxydans sacC-noSP* und *G. oxydans ΔtolB sacC*. Beide Stämme wurden in YS-Medium mit 100 mM Saccharose bei 30 °C für 100 h kultiviert. Die Analyse der Kulturüberstände erfolgte mittels HPLC. Dargestellt ist die Abnahme der Saccharosekonzentration in Kultivierungen von *G. oxydans sacC-noSP* (●) und *G. oxydans ΔtolB sacC* (▲).

### 3.1.2 Identifizierung eines Saccharose-spaltenden Enzyms in *Gluconobacter*-Stämmen

Um eine Alternative zu SacC zu finden, erfolgte eine Analyse potentiell geeigneter Saccharose-spaltender Enzyme in verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen. Dafür wurden mehrere Wildtyp-Stämme in Saccharose-haltigem Medium mit 100 mM Saccharose bei pH 6,5 für 42 h bei 30 °C kultiviert und die Abnahme des Substrats mittels HPLC bestimmt.

Das Screening ergab, dass *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1417 Enzyme besaßen, die eine hoch effiziente Saccharosespaltung ermöglichten (Abb. 9). Die HPLC-Daten beider Stämme zeigten, dass innerhalb einer Kultivierungsdauer von 42 h 98 - 99,2 % der im Medium vorhandenen Saccharose hydrolysiert werden konnte. Beide Stämme wiesen eine deutlich effizientere und schnellere Spaltung des Disaccharids auf, als *G. oxydans sacC-noSP* oder *G. oxydans ΔtolB sacC* mit der rekombinanten Sucrase SacC (vgl. Abb. 8). In Kulturüberständen von *G. japonicus* LMG 1281 und *G. albidus* LMG 1768 konnte hingegen nur eine geringe Abnahme der Saccharosekonzentration von 2 - 5 % detektiert werden (Abb. 9). Die Enzyme dieser Stämme waren daher für den 5-KF-Produktionsprozess nicht geeignet. Als Negativkontrolle diente der Wildtyp-Stamm *G. oxydans* 621H, der keine Enzyme zur Hydrolyse von Saccharose besaß (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Saccharosespaltung in *Gluconobacter* Wildtyp-Stämmen. Alle Stämme wurden in Saccharose-haltigem Medium mit 100 mM Substrat bei 30 °C für 42 h kultiviert. Die Abnahme der Saccharosekonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Eine 100 %ige Spaltung von Saccharose ist definiert als komplette Hydrolyse von 100 mM Saccharose. Die Daten wurden aus drei Analysen berechnet.

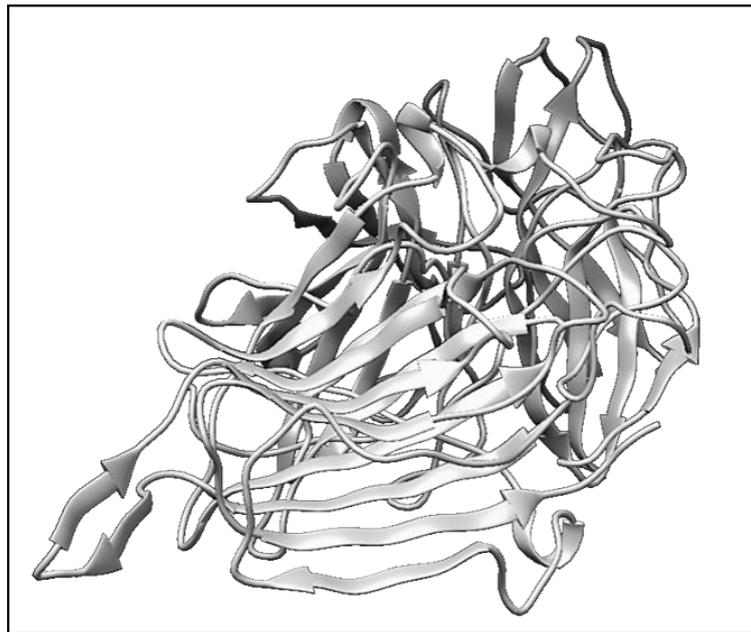
### 3.2 Charakterisierung der Invertase1417

Im nächsten Schritt sollten die Saccharose-spaltenden Enzyme der Stämme *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1417 identifiziert werden. Mit Hinblick auf einen möglichen Einsatz dieser Enzyme zur Hydrolyse von Saccharose in einem industriellen 5-KF-Produktionsprozess, sollten außerdem die kinetischen Parameter, das Substratspektrum und die Möglichkeit zur heterologen Produktion in *G. oxydans* ermittelt werden.

#### 3.2.1 Bioinformatische Analysen zu den Saccharose-spaltenden Enzymen

Zur Identifizierung der zugehörigen Enzyme in *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1417 wurden Proteine gesucht, für die eine Funktion zur Hydrolyse des Substrats Saccharose beschrieben war. Dazu zählten Sucrasen, wie Levan- und Inulosucrasen, Invertasen und Levanasen (Kunst et al. 1977; Martin et al. 1987; Preziosi et al. 1990; O'Mullan et al. 1992; Menéndez et al. 2002). Obwohl das Genom von *G. japonicus* LMG 26773 vollständig sequenziert vorlag, fehlten biochemische Untersuchungen der meisten Proteine des Organismus, weshalb die Analyse im Proteom von *G. japonicus* LMG 1417 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/wgs/>) erfolgte. Durch die bioinformatische Suche wurde in diesem Stamm sowohl eine Levansucrase (KXV23964.1) als auch ein als Levanase (KXV26505.1) annotiertes Enzym identifiziert. Die Levansucrase konnte für die Verwendung zur Saccharosespaltung in dieser Arbeit ausgeschlossen

werden, da die zusätzliche Transfruktosylreaktion des Proteins zur Bildung des Nebenproduktes Levan führt (Dedonder 1966; Lyness und Doelle 1983). Dies war unerwünscht, da somit Fruktoseeinheiten für die Produktion von 5-KF verloren gingen. Levanasen sind hydrolytische, Fruktose- oder Levanbiose-freisetzende Enzyme, bei denen auch die Spaltung von Saccharose beschrieben wurde (Kunst et al. 1977; Blatch und Woods 1993; Wanker et al. 1995; Li et al. 1997; Menéndez et al. 2002). Einige dieser Enzyme weisen zudem hohe Homologien zu Invertasen auf (Martin et al. 1987), weshalb das Enzym KXV26505.1 aus *G. japonicus* LMG 1417 bioinformatisch genauer untersucht wurde. Mit Hilfe der Programme Phyre2 und UCSF Chimera konnte ein erstes Modell des Proteins erstellt werden (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Strukturmodell des Enzyms Inv1417 (KXV26505.1, aus *G. japonicus* LMG 1417). Erstellt und modelliert durch Phyre2 und UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004; Kelley et al. 2015).

Eine Blastp-Analyse von KXV26505.1 aus *G. japonicus* LMG 1417 zeigte, dass dieses Protein auch in *G. japonicus* LMG 26773 (KXV40112.1) vorhanden war. Da beide Stämme zur Hydrolyse von Saccharose befähigt waren, handelte es sich hierbei vermutlich um das zugehörige Saccharose-spaltende Enzym. Für die Stämme *G. oxydans* und *G. japonicus* LMG 1281 konnte im Zuge der bioinformatischen Analysen kein vergleichbares Enzym identifiziert werden, was den Beobachtungen des experimentellen Versuchs entsprach (siehe Abschnitt 3.1.2). Zudem erfolgte ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Enzyme KXV40112.1 (Invertase26773, im Folgenden Inv26773) und KXV26505.1 (Invertase1417, im Folgenden Inv1417), wobei eine 99 %ige Identität ermittelt wurde (Abb. 11). Eine Analyse mit den Programmen SignalP-5.0 (Nielsen et al. 1997; Petersen et al. 2011) und Phobius (Käll et al. 2004) zeigte, dass die Enzyme beider Stämme ein N-terminales Tat-Signalpeptid mit vorhergesagter Spaltposition zwischen den Aminosäuren 38 und 39 tragen (Abb. 11, schwarze Markierung).

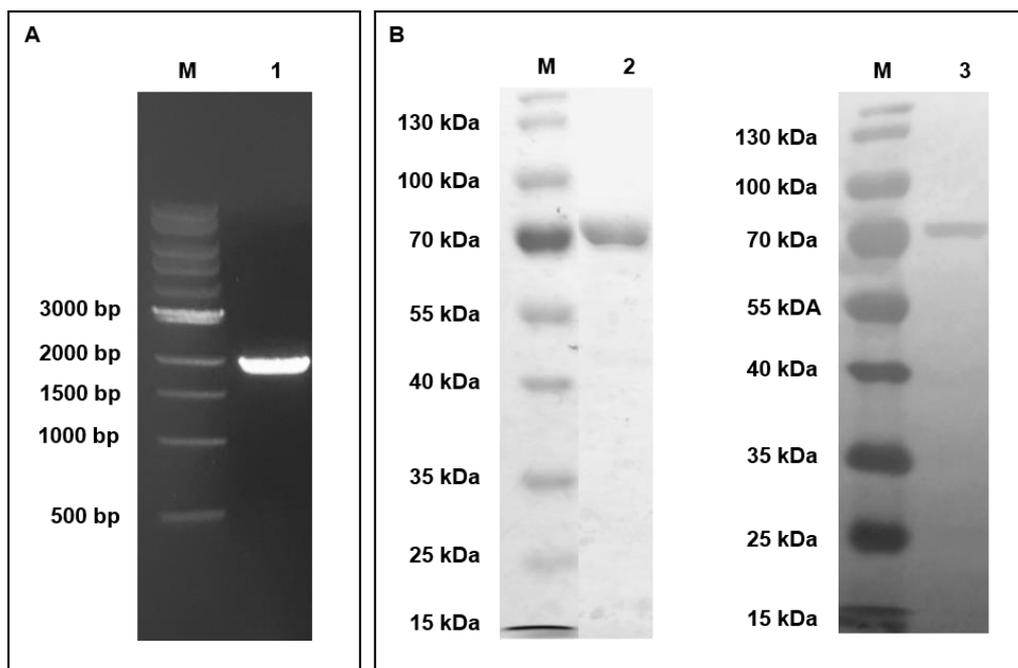
KXV40112.1	MLPGMTDQNDRPSLGRRSALASILAAGASVSAVRVARAAEETPVSAMTPHHDEPSNSHQE	60
KXV26505.1	MLPGMTDQNDRPSLGRRSALASILAAGASVSAARVARAAEETPVSAMTPHHDEPSNSHQE *****	60
KXV40112.1	PGNHSAVASQPVVRTQSDYLYRPTIHFSPETGFMDPNGLIFDGRTFHLYYQYDFAPYA	120
KXV26505.1	PGNHSAVASQPVVRTQSDYLYRPTIHFSPETGFMDPNGLIFDGRTFHLYYQYDFAPYA *****	120
KXV40112.1	GQVHWGHATSTDLYTWQDQTIADQTAAGEAYS GCVVLD RDNV SGLFPAQKATDPSETHA	180
KXV26505.1	GQVHWGHATSTDLYTWQDQPIADQTAAGEAYS GCVVLD RDNV SGLFPAQKATDPSETHA *****	180
KXV40112.1	RGPATATQAAIDALTPSLGKASSDVLPSPENMDALGPSAAAPFGHVDPPTADLPPVTS	240
KXV26505.1	KGPATATQAAIDALTPSLGKASSDVLPSPENMDALGPSAAAPFGHVDPPTADLPPVTS :*****	240
KXV40112.1	SAPTLPPMAGGLVALYTRATPRQQTQYLAWSPDGGKRFIDHTQNPVLDIGLNSFRDPKVF	300
KXV26505.1	SAPTLPPMAGGLVALYTRATPRQQTQYLAWSPDGGKRFIDYTHNPVLDIGLNSFRDPKVF ***** :*****	300
KXV40112.1	WHEPSGKWMVVVKARAHKVAFYGSIDLKHWMLSDFGPAGLFGVDYECPNLIELPIEED	360
KXV26505.1	WHEPSGKWMVVVKARAHKVAFYGSIDLKHWMLSDFGPAGLFGVDYECPNLIELPIEED ***** :*****	360
KXV40112.1	GKNTRWVLFVSVNPGGPQGGSVTQYFVGDFDGERFIPENTVIGLTDFAKDSYAMQVYENL	420
KXV26505.1	GKNTRWVLFVSVNPGGPQGGSVTQYFVGDFDGERFIPENTVIGLTDFAKDSYAMQVYENL *****	420
KXV40112.1	PLNEAVYFAWLGWQYCEEVPNRSWRGLMTPVPTLSLRRDDMNWRLVQRPKGLEQLRGE	480
KXV26505.1	PLNEAVYFAWLGWQYCEEVPNRSWRGLMTPVPTLSLRRDDMNWRLVQRPKGLEQLRGE *****	480
KXV40112.1	AIPFKVGRIGAQSGVQVSIPTGQAIELSLTVTVDERKNPQPDGNKGRAGRFLIVFSNGQG	540
KXV26505.1	AIPFKVGRIGAQSGVQVSIPTGQAIELSLTVTVDERKNPQPDGNKGRAGRFLIVFSNGQG *****	540
KXV40112.1	ETLSIGFDAFSAQLWLD RGD LHGFSQPFFTERFSTPLTANSRRFSMKIVLDACALEIFAN	600
KXV26505.1	ETLSIGFDAFSAQLWLD RGD LHGFSQPFFTERFSTPLTANSRRFSMKIVLDACALEIFAN *****	600
KXV40112.1	DGLSVGTALVFPSSPLDTLSLQATNAGAMVEDLSLYPLRKTMNRPTAM	648
KXV26505.1	DGLSVGTALVFPSSPLDTLSLQATNAGATVEDLSLYPLRKTMNRPTAM *****	648

**Abbildung 11:** Alignment der Aminosäuresequenzen von KXV40112.1 (Inv26773) und KXV26505.1 (Inv1417). Das Sequenz-Alignment wurde durch ClustalOmega erstellt. Mittels SignalP-5.0 wurde ein N-terminales Tat-Signalpeptid identifiziert, das durch die schwarze Markierung hervorgehoben ist. Das Ende dieser Umrandung zeigt die Position an, an der das Signalpeptid abgespalten wird. Ein Stern (\*) kennzeichnet konservierte Bereiche, eine Lücke ( ) Stellen, an denen keine Ähnlichkeiten zwischen den Aminosäuren vorlag. Mit einem Doppelpunkt (:) werden chemisch vergleichbare Aminosäuren dargestellt und ein Punkt (.) weist auf Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften hin.

### 3.2.2 Klonierung, Überproduktion und Aufreinigung von Inv1417

Zur Charakterisierung des Saccharose-spaltenden Enzyms aus *G. japonicus* LMG 1417 wurde ein System zur heterologen Proteinproduktion auf Basis des Vektors pASK-IBA5 (pASK5) etabliert. Zur Amplifizierung von Inv1417 wurden die Oligonukleotide Inv1417\_XhoI\_for und Inv1417\_SacI\_rev verwendet. Das erwartete Fragment wies eine Größe von 1980 bp auf, was mittels Gelelektrophorese bestätigt werden konnte (Abb. 12 A). Die Klonierung erfolgte durch einen

Restriktionsverdau mit *Xho*I und *Sac*I. Nach Transformation des fertigen Plasmids in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde der mittels Kolonie-PCR überprüfte Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK5-*inv1417* zur Überproduktion von Inv1417 eingesetzt. Über die pASK5-vermittelte Fusion eines N-terminalen Strep-Tags an die Invertase konnte anschließend eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Die Analyse des aufgereinigten Proteins erfolgte durch eine SDS-Page und einen Westernblot (Abb. 12 B). In beiden Gelen konnte eine einzelne Bande mit einer Größe von 70 kDa detektiert werden, was der bioinformatisch berechneten Größe für die rekombinante Invertase1417 mit Strep-Tag entsprach.

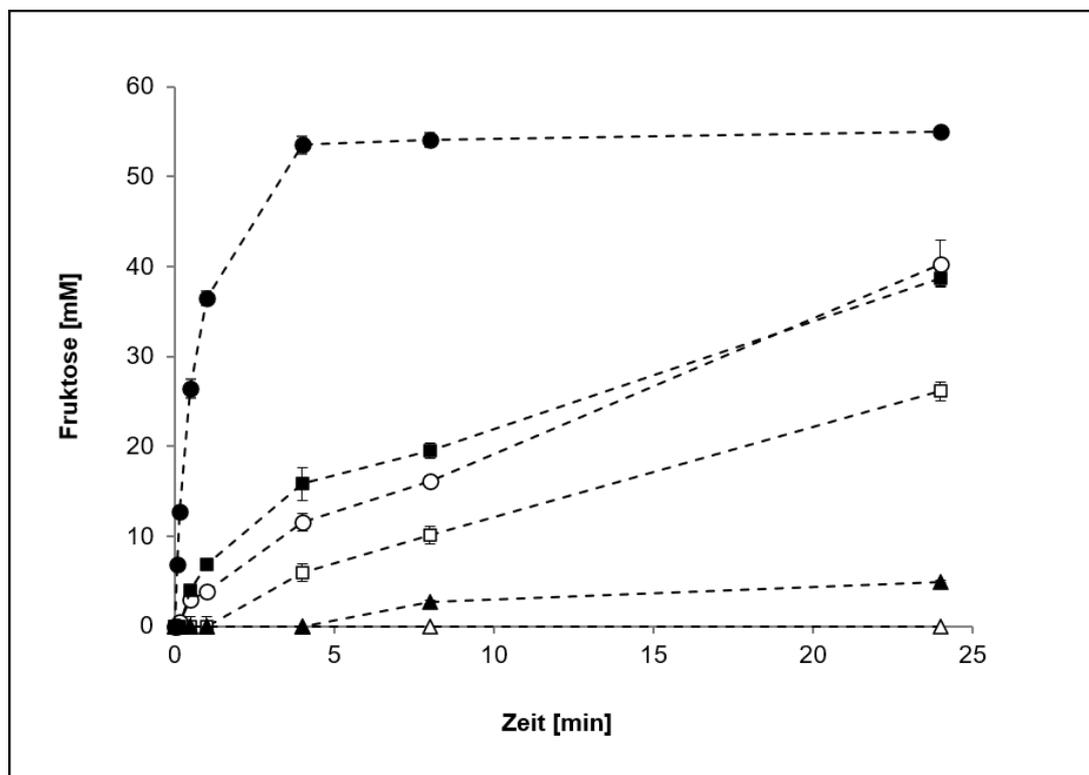


**Abbildung 12:** Gelelektrophorese und SDS-Page-Analyse von Inv1417. A: Gelbild des mittels PCR amplifizierten Gens. M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). 1: Amplifikat mit der erwarteten Fragmentgröße von 1980 bp. B: SDS-Page Analyse. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). 2: Silberfärbung und 3 Westernblot des aufgereinigten Proteins.

### 3.2.3 Substratspektrum von Inv1417

Um das Enzym genauer zu charakterisieren, erfolgte eine Analyse der enzymatischen Reaktion unter Verwendung verschiedener Fruktose-haltiger Substrate. Dazu wurden die Verbindungen Saccharose, Raffinose, Levanbiose, Levantriose, 1-Kestose, Levan, Melezitose, Turanose, Maltulose, Lactulose, Palatinose und Inulin eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC über die Zunahme der Fruktosekonzentration als Ergebnis einer Spaltung des eingesetzten Substrats. Es zeigte sich, dass Inv1417 eine Substratspezifität für Fruktose-haltige Di- und Trisaccharide aufwies (Abb. 13). Als Hauptsubstrat des Enzyms konnte Saccharose ermittelt werden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (pH 6,5 und 30 °C) ergab sich für diese Verbindung eine spezifische Aktivität von  $697 \pm 53$  U/mg Protein. Zudem konnten auch Raffinose, Levanbiose, Levantriose und 1-Kestose durch Inv1417 hydrolysiert werden (Abb. 13). Die spezifische Aktivität verringerte sich für diese Substrate jedoch. Melezitose, Turanose, Maltulose, Lactulose und Palatinose sowie die Polyfruktane Levan und Inulin wurden nicht gespalten. Anhand des ermittelten

Substratspektrums konnte das als Levanase annotierte Enzym Inv1417 (KXV26505.1) aus *G. japonicus* LMG 1417 in die Klasse der  $\beta$ -Fruktofuranosidasen bzw. Invertasen (EC 3.2.1.26) eingeteilt werden. Enzyme dieser Proteinfamilie werden durch ihre Fähigkeit zur Hydrolyse terminaler, nicht reduzierender  $\beta$ -D-Fruktofuranosid-Einheiten aus entsprechenden Di- oder Oligosacchariden charakterisiert (Neuberg und Roberts 1946; Neumann und Lampen 1967; Liebl et al. 1998; Nadeem et al. 2015).

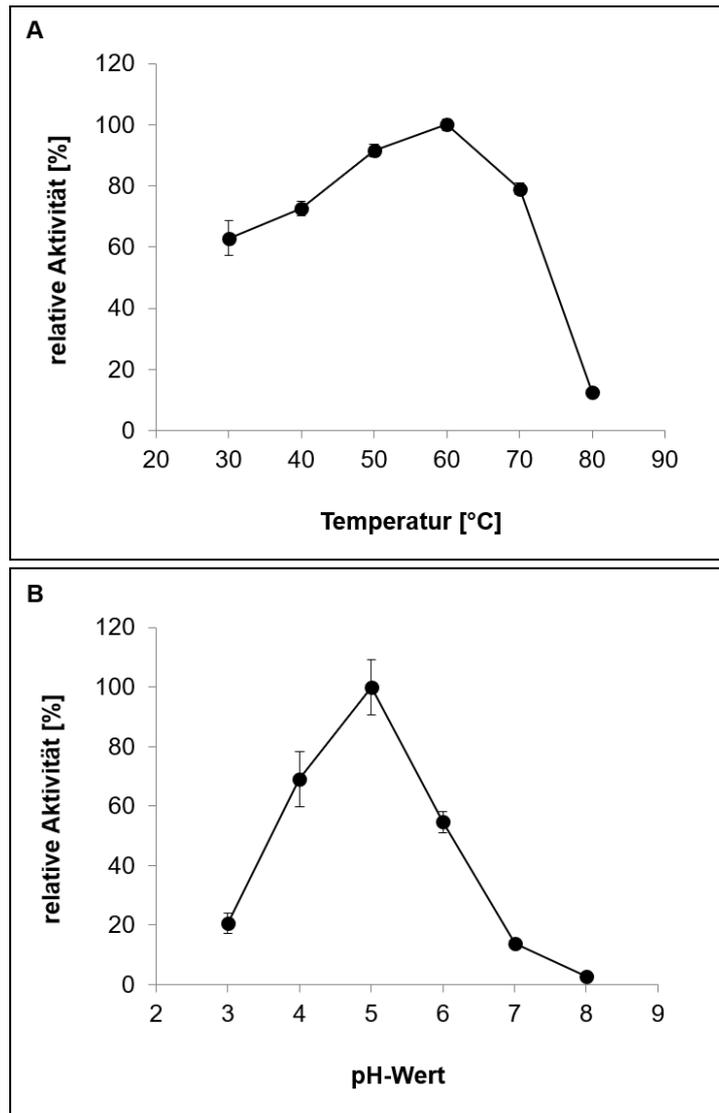


**Abbildung 13:** Substratspektrum der Invertase 1417. Dargestellt ist die Fruktosefreisetzung, die bei der Spaltung der folgenden Substrate durch die Invertase entsteht: Saccharose (●), Raffinose (■), 1-Kestose (▲), Levan (△), Levanbiose (○), Levantriose (□). Der Assay bestand aus 1 mL 50 mM MES-Puffer, pH 6,5 und jeweils 50 mM des eingesetzten Substrats. Die Reaktion wurde bei 30 °C durchgeführt und unter Zugabe von 1  $\mu$ g aufgereinigtem Enzym gestartet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten durch eine 1:6 Verdünnung mit 96 % [v/v] Ethanol. Die Analyse erfolgte mittels HPLC. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Messungen mit den daraus errechneten Standardabweichungen.

### 3.2.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von Inv1417

Nachdem Saccharose als hauptsächliches Substrat für Inv1417 festgelegt werden konnte, wurde das aufgereinigte Protein im nächsten Schritt verwendet, um den optimalen Temperatur- und pH-Bereich zu ermitteln. Dafür wurden enzymatische Tests mit aufgereinigter Invertase und verschiedenen Temperatur- bzw. pH-Werten durchgeführt. Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der verwendete Puffer im Enzymassay mit einem konstanten pH-Wert eingesetzt (vgl. Kapitel 2.5.4.1), während die Reaktionstemperatur zwischen 30 °C und 80 °C variierte. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC. Als Temperaturoptimum von Inv1417 konnten dabei 60 °C ermittelt werden (Abb. 14 A). Bei dieser Temperatur wies das Enzym jedoch nur eine

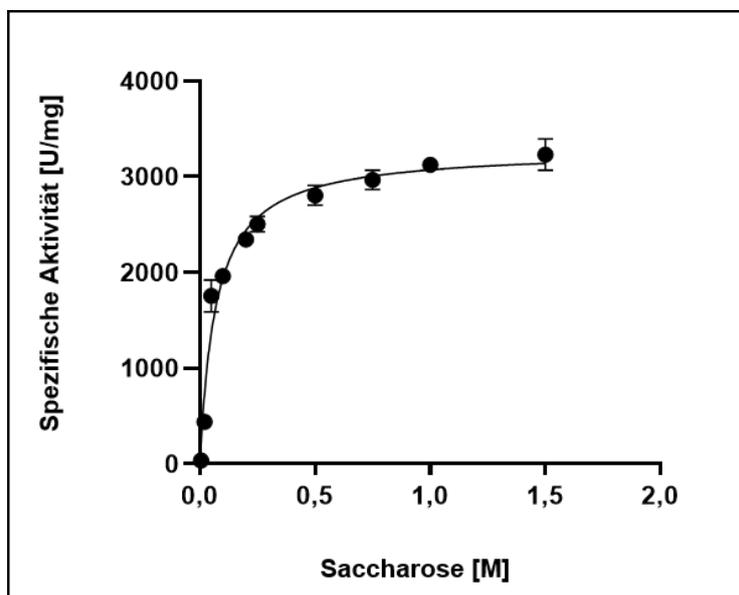
Halbwertszeit von weniger als 5 min auf. Dies deutete darauf hin, dass es sich um ein nicht-thermostabiles Enzym handelte. Eine Verringerung der Temperatur auf die im Produktionsprozess eingesetzte Kultivierungstemperatur von 30 °C zeigte, dass das Enzym neben einer besseren Stabilität auch noch 65 % seiner maximalen Aktivität bei 60 °C aufwies (Abb. 14 A). Die Ermittlung des optimalen pH-Wertes erfolgte dementsprechend angepasst an einen späteren Produktionsprozess bei einer festen Temperatur von 30 °C. Die eingesetzten Puffer variierten in ihrem pH-Wert zwischen pH 3 und pH 8. Unter diesen Bedingungen konnte für Inv1417 ein pH-Optimum zwischen pH 4,0 und 6,0, mit einem Maximum bei pH 5,0 ermittelt werden (Abb. 14 B).



**Abbildung 14:** Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen der Invertase 1417. Die Messungen erfolgten mit 1 µg aufgereinigtem Enzym bei variierenden Temperatur- bzw. pH-Werten. Als Substrat wurde Saccharose eingesetzt. A: Bestimmung der optimalen Temperatur. B: Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein pH-Wert zwischen 6 und 6,5 als Parameter für den 5-KF-Produktionsprozess festgelegt. In diesem Bereich erreichte Inv1417 noch 55 % der maximalen Aktivität. Zudem erwies sich dieser pH-Bereich bei vorherigen Produktionen mit *G. oxydans* aus Fruktose auch für die membrangebundene FDH als geeignet (Siemen 2017).

Durch eine nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten wurden die kinetischen Parameter der Invertase bei einer Temperatur von 60 °C und einem pH-Wert von 5 bestimmt. Als  $K_M$ -Wert konnten  $63 \pm 11$  mM ermittelt werden.  $V_{max}$  lag bei  $3285 \pm 179$  U/mg Protein (Abb. 15).

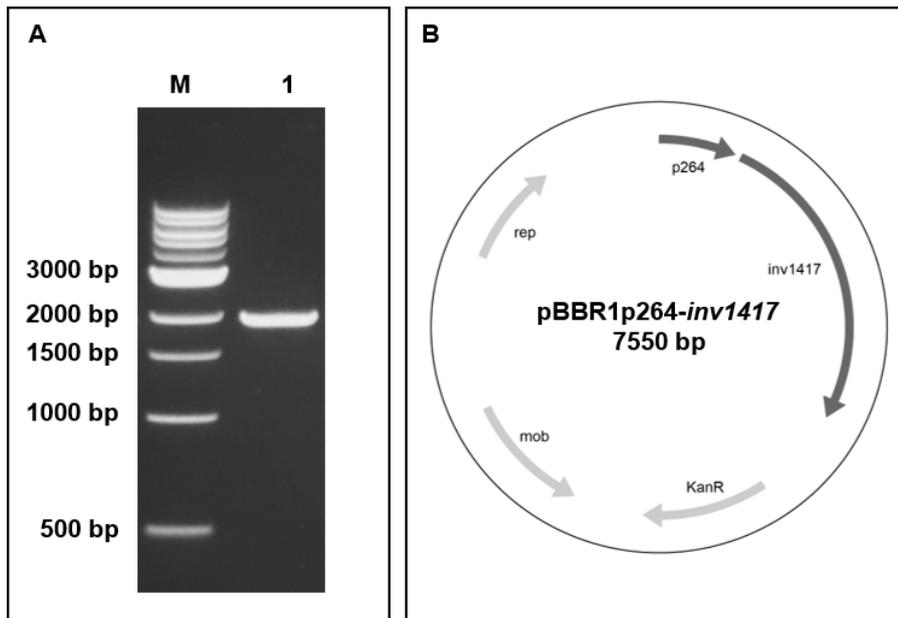


**Abbildung 15:** Michaelis-Menten-Kinetik zur Ermittlung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  von Inv1417. Die Reaktion erfolgte unter den optimalen Parametern, die mit einer Temperatur von 60 °C und einem pH-Wert von 5 festgelegt wurden. Die spezifische Aktivität betrug unter diesen Parametern  $3285 \pm 179$  U/mg Protein bei einem  $K_M$ -Wert von  $63 \pm 11$  mM. Die nicht-lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 8.

Um die spezifische Aktivität der Invertase unter Kultivierungsparametern für *G. oxydans* im Produktionsprozess zu charakterisieren, erfolgte eine Analyse bei einer Temperatur von 30 °C. Unter diesen Bedingungen konnte für die Hydrolyse von Saccharose ein  $V_{max}$  von  $2295 \pm 243$  U/mg Protein ermittelt werden. Inv1417 stellte damit eine Verbesserung zum bisher verwendeten Enzym SacC dar und eignete sich für den Einsatz zur Produktion von 5-KF aus Saccharose.

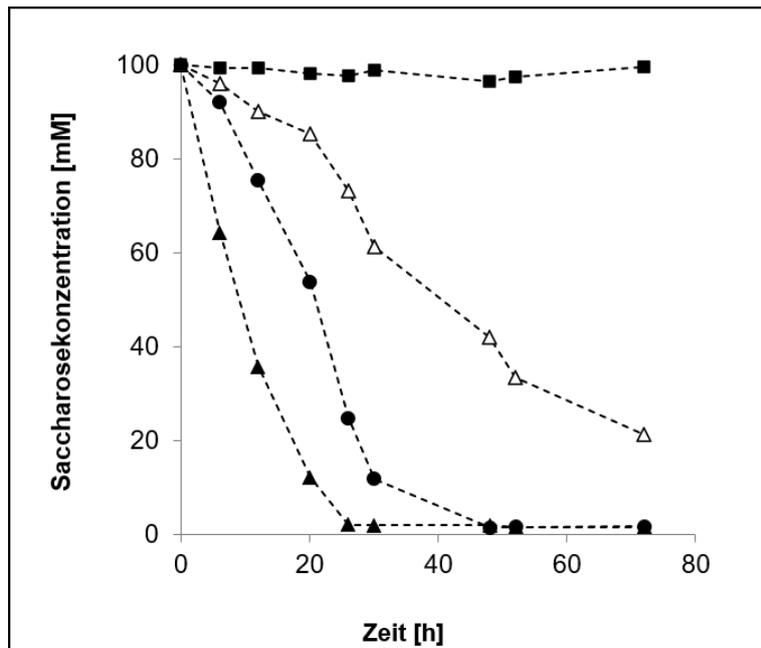
### 3.2.5 Heterologe Produktion von Inv1417 in *G. oxydans*

Als Voraussetzung für den Einsatz von Inv1417 zur Saccharosespaltung in der 5-KF-Synthese wurde im nächsten Schritt die Plasmid-vermittelte Produktion im bisherigen Expressionsstamm *G. oxydans* getestet. Zur Konstruktion eines geeigneten Expressionsplasmids wurde als Basis der Vektor pBBR1p264 verwendet. Zur Amplifizierung des Gens *inv1417* wurden die Primer *inv1417-Sall-for* und *inv1417-HindIII-rev* eingesetzt. Das PCR-Produkt wies die erwartete Größe von 1980 bp auf (Abb. 16 A). Nach Restriktionsverdau und Ligation wurde eine Transformation des fertigen Plasmids pBBR1p264-*inv1417* (Abb. 16 B) in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen durchgeführt. Mittels Elektroporation erfolgte anschließend das Einbringen in *G. oxydans*, wodurch der Stamm *G. oxydans* pBBR1p264-*inv1417* (nachfolgend als *G. oxydans inv* bezeichnet) generiert wurde. Durch eine Kolonie-PCR wurde das Vorhandensein des Gens *inv1417* überprüft und verifiziert. Auch die anschließende Sequenzierung des Konstruktes bestätigte die korrekte DNA-Sequenz.



**Abbildung 16:** Agarosegel und Vektorkarte von pBBR1p264-*inv1417* für die heterologe Produktion der Invertase in *G. oxydans*. A: Agarosegel des Amplifikats *inv1417*. M: 1 kb DNA-Ladder (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Lane 1: Amplifikat mit einer Größe von 1980 bp. B: Plasmidkarte von pBBR1p264-*inv1417*. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, p264: Promotorregion des Gens *gox0264*, rep: Replikationsursprung, mob: Mobilisierungsgen.

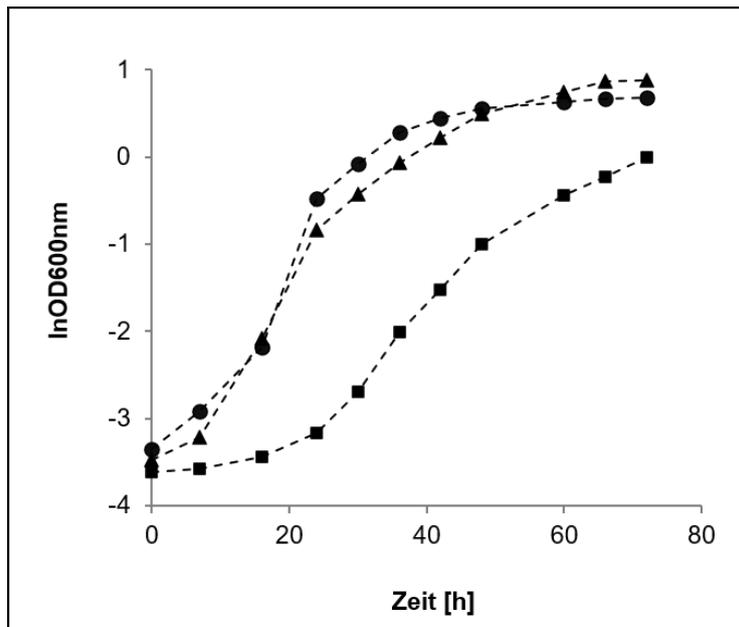
Zur Analyse der Saccharosespaltung erfolgte eine Kultivierung von *G. oxydans inv* in YS-Medium mit 100 mM Saccharose. Die Abnahme der Substratkonzentration wurde in den Kulturüberständen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC detektiert. Daraus ging hervor, dass *G. oxydans inv* zur heterologen Proteinproduktion befähigt war. Durch die rekombinante Invertase1417 konnten innerhalb von 48 h 100 mM des Disaccharids hydrolysiert werden (Abb. 17). Die Umsatzraten in *G. oxydans inv* lagen bei  $2,9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und waren somit vergleichbar mit der Aktivität des Wildtyp-Stammes *G. japonicus* LMG 1417 mit  $2,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , der sich aufgrund einer Levansynthese jedoch nicht als alternativer Produktionsorganismus eignete. Zusätzlich wurde die Saccharosespaltung durch *G. oxydans sacC-noSP*, der die Sucrase SacC ohne eingefügtes Signalpeptid trug (vgl. Kapitel 3.1.1.3), unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Nach einer Kultivierungsdauer von 48 h lagen in Kulturüberständen dieses Stammes noch ca. 50 % der ursprünglichen Saccharosekonzentration vor (Abb. 17). Dadurch konnte bestätigt werden, dass SacC geringere Enzymaktivitäten oder eine weniger effiziente Translokation aufwies, als Inv1417. Aufgrund dieser Ergebnisse ersetzte die Invertase aus *G. japonicus* LMG 1417 in allen nachfolgenden Prozessen zur 5-KF-Produktion aus dem Substrat Saccharose das bisher verwendete Enzym SacC. Weiterhin bestätigten die vorliegenden Daten, dass *G. oxydans* als Wildtyp keine Saccharose-spaltenden Enzyme besitzt, da keine Abnahme der Substratkonzentration detektiert werden konnte (Abb. 17). Eine heterologe Proteinproduktion war für den Prozess der 5-KF-Produktion mit *G. oxydans* als Produktionsstamm somit unumgänglich.



**Abbildung 17:** Saccharosespaltung durch heterologe Proteinproduktion in *G. oxydans*. Dargestellt ist die Abnahme von Saccharose durch die heterolog produzierten Enzyme SacC in *G. oxydans sacC-noSP* (Δ) und Inv1417 in *G. oxydans inv* (●). Als Negativkontrolle wurde *G. oxydans* (■) mitgeführt. *G. japonicus* LMG 1417 diente als natürlicher Produzent von Inv1417 als Positivkontrolle (▲).

### 3.3 Festlegung der Pufferbedingungen für die Kultivierung von *G. oxydans inv* im 5-KF-Produktionsprozess

Um die optimalen Wachstumsbedingungen für die Synthese von 5-KF mit *G. oxydans inv* zu bestimmen, wurden verschiedene Puffer in Kultivierungen in Saccharose-haltigem Medium eingesetzt. Dabei variierte das Wachstum je nach eingesetztem Puffer bei einheitlichem pH-Wert (Abb. 18). *G. oxydans inv* zeigte bei dem Einsatz von MES-Puffer oder Calciumcarbonat vergleichbare Wachstumsraten von  $0,14 \text{ h}^{-1}$  und eine entsprechende Verdopplungszeit von 4,8 - 4,9 h in der exponentiellen Phase. Wurde Kaliumphosphat-Puffer verwendet, verlangsamte sich das Wachstum. Die Wachstumsraten lagen in diesem Fall in der exponentiellen Phase bei  $0,09 \text{ h}^{-1}$  und einer Verdopplungszeit von 7,6 h. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der auf Kaliumphosphat basierende Puffer für den Produktionsprozess ausgeschlossen. Calciumcarbonat lag bei neutralen pH-Werten ungelöst vor, wodurch der osmotische Stress für die Zellen zwar gering gehalten wurde, gleichzeitig aber eine starke Trübung der Kulturen auftrat. Um dennoch die optischen Dichte der Kulturen messen zu können, mussten alle Proben vorher mit 15 %iger Essigsäure behandelt werden. Durch dieses Absenken des pH-Wertes entstand lösliches Di-Hydrogencarbonat, das im nächsten Schritt zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zerfällt, wodurch die Trübung aufgehoben wird. Da sich zwischen Calciumcarbonat und MES-Puffer kaum Unterschiede im Wachstum zeigten (Abb. 18), fiel die Entscheidung aufgrund der leichteren Handhabung und trotz der höheren Kosten auf den MES-basierten Puffer.



**Abbildung 18:** Wachstum von *G. oxydans inv* unter Verwendung verschiedener Puffer. Die Kultivierung erfolgte in YS-Medium mit 100 mM Saccharose bei pH 6,5 für 72 h bei 30 °C. Als Puffer wurden jeweils 100 mM MES (●), 100 mM Calciumcarbonat (▲) oder 100 mM Kaliumphosphat (■) zugegeben.

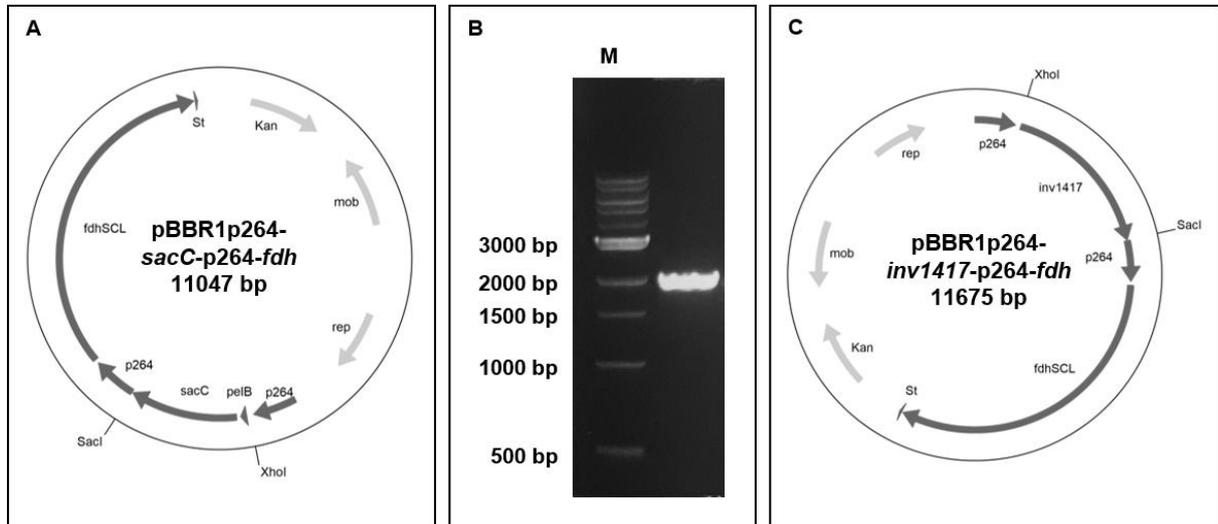
### 3.4 Generierung eines industriell einsetzbaren Ein-Stamm-Systems zur Produktion von 5-KF aus Saccharose

Nachdem eine Optimierung der Saccharosespaltung durch den Einsatz von Inv1417 erfolgen konnte, wurden verschiedene Möglichkeiten zur Generierung eines Ein-Stamm-Systems getestet. Ziel war es, dadurch das bisherige Zwei-Stamm-System von Siemen et al. (2018) zu ersetzen, da dieses aufgrund der Co-Kultivierung zweier Stämme noch nicht optimal an industrielle Maßstäbe angepasst war (vgl. Kapitel 4.2). Die Schwierigkeit bei der Konstruktion eines geeigneten einzelnen Expressionsstammes bestand in der heterologen Produktion der Schlüsselenzyme des Produktionsprozesses, Inv1417 und FDH, mit ausreichend hohen Enzymaktivitäten. Im Hinblick auf den industriellen Einsatz des Ein-Stamm-Systems zur 5-KF-Synthese sollten zudem hohe Produktausbeuten in einer möglichst geringen Kultivierungsdauer erzielt werden.

#### 3.4.1 Plasmid-vermittelte Co-Produktion von FDH und Inv1417

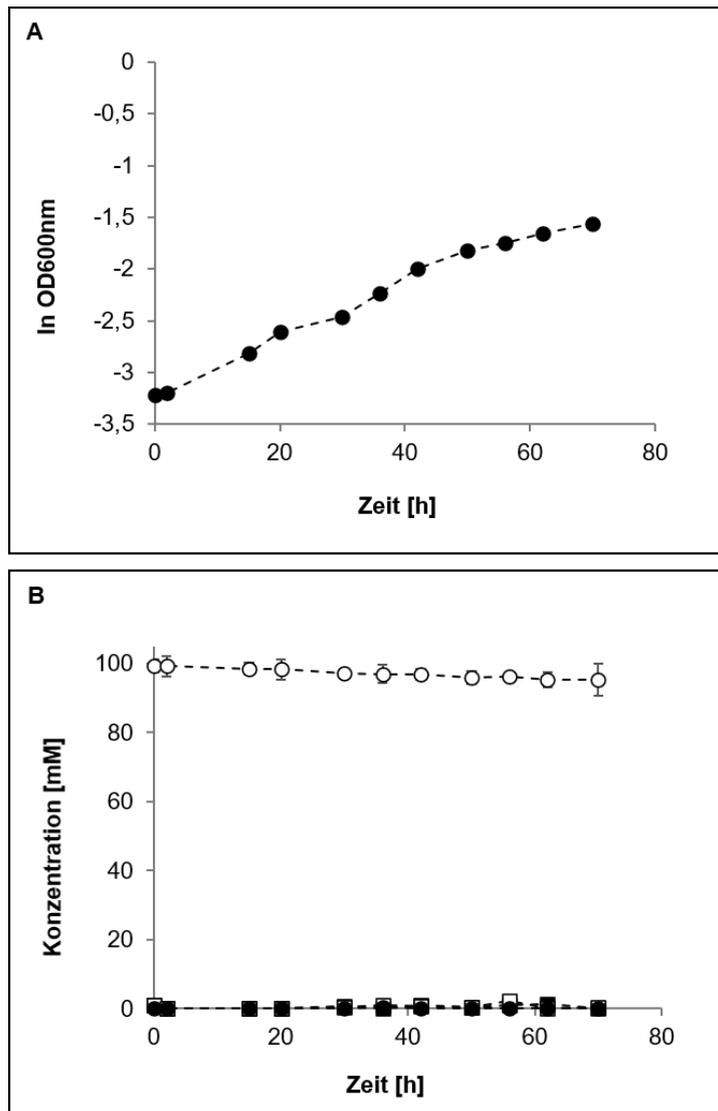
Eine Möglichkeit zur Generierung eines einzelnen Expressionsstammes für die 5-KF-Synthese lag in der Plasmid-vermittelten Co-Produktion der Schlüsselenzyme Inv1417 und FDH auf einem Vektor. Dies wurde bereits in der Doktorarbeit von Anna Siemen (2017) für die Enzyme FDH und SacC durch verschiedene Konstrukte getestet, blieb aber ohne Erfolg. Da die heterolog in *G. oxydans* produzierte Sucrase nur geringe spezifische Aktivitäten aufwies, war es möglich, dass das Ausbleiben der Saccharosespaltung bei Plasmid-vermittelter Co-Produktion (Siemen 2017) auf SacC zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde *sacC* auf dem Plasmid pBBR1p264-*sacC*-p264-*fdh* (Abb. 19 A) durch einen Klonierungsschritt über die Schnittstellen *Xho*I und *Sac*I gegen *inv1417* ausgetauscht. Die Amplifizierung von *inv1417* (1980 bp) erfolgte entsprechend mit den Primern Inv1417\_*Xho*I\_for/Inv1417\_*Sac*I\_rev und das Fragment wurde anschließend ebenfalls mit

den Enzymen *Xho*I und *Sac*I verdaut. Nach einer Ligation konnte das so entstandene Plasmid pBBR1p264-*inv1417*-p264-*fdhSCL* (Abb. 19 C) in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen und nachfolgend durch Elektroporation in *G. oxydans* transformiert werden. Der Nachweis des Konstruktes in *G. oxydans* *inv-fdh* erfolgte mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein von *inv1417*. Das zugehörige Agarosegel zeigte eine passenden Bande mit einer Größe von 2000 bp (Abb. 19 B), wodurch die Aufnahme des Plasmids bestätigt wurde.



**Abbildung 19:** Klonierungsschema für eine Plasmid-vermittelte Co-Produktion von FDH und Invertase. A: Ausgangsplasmid pBBR1p264-*sacC*-p264-*fdh* (Siemen 2017). Durch einen Restriktionsverdau mit die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Sac*I wurde *sacC* durch *inv1417* ausgetauscht. B: Agarosegel nach Kolonie-PCR zur Überprüfung des Genaustauschs. Das Amplifikat wurde unter Einsatz der Primer *Inv1417\_XhoI\_for/Inv1417\_SacI\_rev* generiert und wies die erwartete Fragmentgröße von 1980 bp auf. M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). C: Plasmid nach Genaustausch. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, rep: Replikationsursprung, p264: Promotorregion des Gens *gox0264*, mob: Mobilisierungsgen.

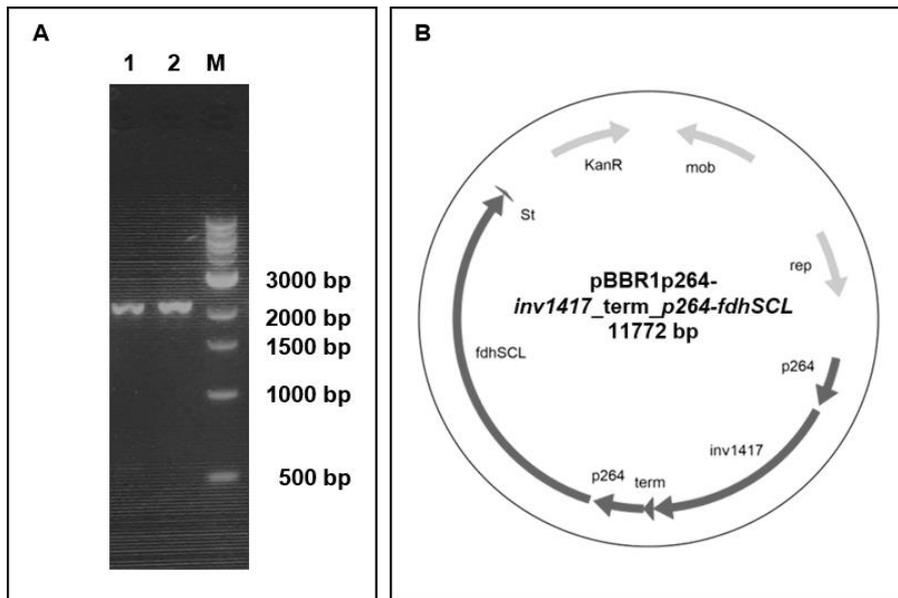
Die Funktionalität des Stammes *G. oxydans* *inv-fdh* zur Produktion von 5-KF aus Saccharose wurde durch eine Kultivierung in YS-Medium mit 100 mM Saccharose überprüft. Die Durchführung erfolgte im Doppelansatz für 70 h bei 30 °C. Bei der Betrachtung des Wachstums fiel auf, dass *G. oxydans* *inv-fdh* in Saccharose-haltigem Medium nur sehr geringe Zelldichten erreichte (Abb. 20 A). Als finale optische Dichte am Ende des Experimentes konnte lediglich ein Wert von 0,21 bestimmt werden. Dies deutete darauf hin, dass keine Saccharosespaltung erfolgen konnte und das Wachstum nur aus der im Medium vorliegenden Menge an Hefeextrakt resultierte. Die zugehörige HPLC-Analyse der Kulturüberstände bestätigte diese Annahme. Eine Abnahme der Saccharosekonzentration im Medium konnte nicht detektiert werden (Abb. 20 B), da keine Hydrolyse des Disaccharids stattgefunden hat.



**Abbildung 20:** Wachstum und Saccharoseverwertung von *G. oxydans inv-fdh*. A: Wachstumsverlauf von *G. oxydans inv-fdh* in Saccharose-haltigem Medium mit 100 mM Saccharose, pH 6,5, bei 30 °C. B. HPLC-Analyse der Kulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt ist das Substrat Saccharose (○), die aus der Spaltung resultierenden Monosaccharide Fruktose (□) und Glukose (■) sowie 5-KF (●).

Um auszuschließen, dass das Ausbleiben der Saccharosespaltung in den Wachstumsversuchen auf Problemen bei der Transkription der Plasmid-kodierten Gene beruhte, wurde eine Terminationssequenz für die RNA-Polymerase zwischen *inv1417* und *fdhSCL* kloniert. Da auf dem ursprünglichen Konstrukt pBBR1p264-*inv1417*-p264-*fdhSCL* keine Terminationssequenz vorhanden war (Abb. 21 A), wäre es denkbar, dass eine durchgängige, undefinierte mRNA gebildet wurde. Dies könnte die Entstehung von Sekundärstrukturen fördern und schließlich die Translation inhibieren, wodurch eine Bildung funktioneller Enzyme entfallen würde. Als geeignete Sequenz wurde der Terminationsbereich des Gens *gox0265* aus *G. oxydans* 621H ausgewählt, da so von einer Erkennung dieser Region durch den Transkriptionsapparat des Produktionsstammes auszugehen war. Die Identifizierung des Bereichs erfolgte durch eine Sequenzanalyse mit Hilfe der Online-Software Softberry-FindTerm (<http://www.softberry.com>) (Abb. 21 B).

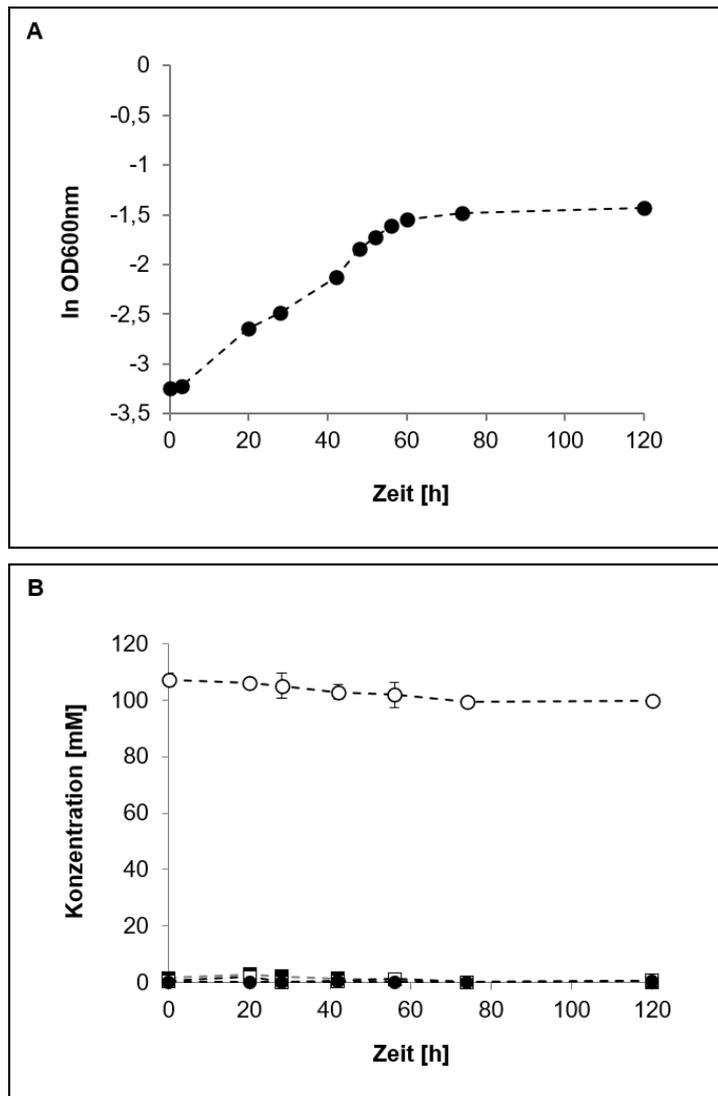




**Abbildung 22:** Generierung des Plasmids pBBR1p264-*inv1417\_term\_p264-fdhSCL*. A: Nachweis der eingefügten Terminationssequenz (*term*) von *gox0265* hinter der Gensequenz von *inv1417*. Unter Einsatz der Primer Inv1417\_XhoI\_for/Term\_inv1417\_fdh\_rev konnte ein Fragment mit der erwarteten Größe von 2091 bp generiert werden. B: Plasmidkarte von pBBR1p264-*inv1417\_term\_p264-fdhSCL*. Kan: Kanamycin-Resistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen, rep: Replikationsursprung, p264: Promotorregion von *gox0264*.

Die Auswirkung der integrierten Terminationssequenz auf die Co-Produktion der Enzyme wurde durch eine Kultivierung von *G. oxydans inv-term-fdh* in YS-Medium mit 110 mM Saccharose bei pH 6,2 getestet. Die Abnahme von Saccharose und die Produktion von 5-KF dienten dabei als Bestätigung der Funktionalität der heterologen Co-Produktion von Inv1417 und FDH. Durch Ermittlung der optischen Dichte konnte erneut kein Wachstum für *G. oxydans inv-term-fdh* mit Saccharose als Substrat nachgewiesen werden (Abb. 23 A). Eine Spaltung des Disaccharids wurde mittels HPLC-Analyse in den Kulturüberständen des Stammes ebenfalls nicht detektiert (Abb. 23 B). Die fehlende Terminationsregion im Plasmid pBBR1p264-*inv1417-p264-fdhSCL* konnte damit als Ursache für die nicht vorhandene hydrolytische Aktivität des Stammes *G. oxydans inv-fdh* ausgeschlossen werden.

Weder der Austausch von *sacC* gegen *inv1417*, noch das Einfügen einer Terminationssequenz führten zu einer Plasmid-vermittelten Co-Produktion der Enzyme FDH und Inv1417, die für eine Produktion von 5-KF aus Saccharose notwendig waren. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher nach anderen Möglichkeiten zur Generierung eines Ein-Stamm-Systems gesucht.



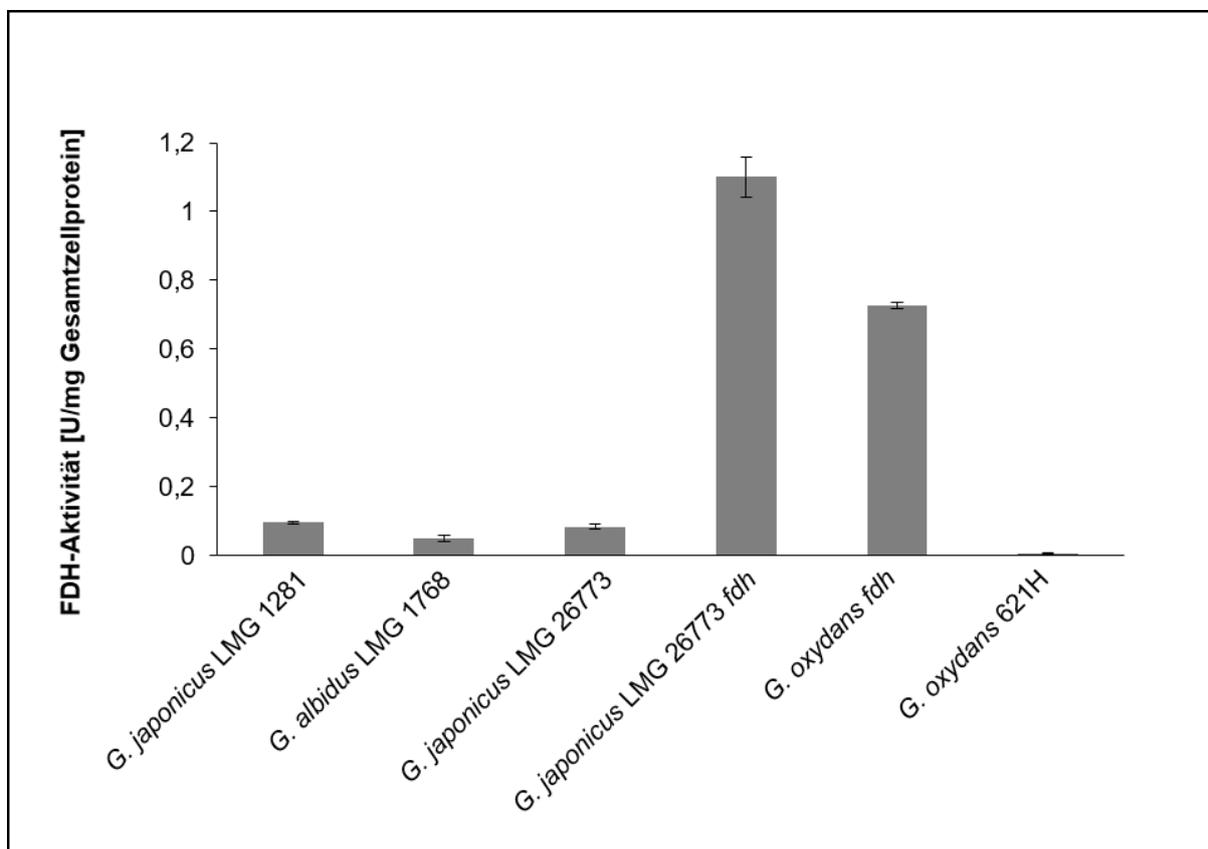
**Abbildung 23:** Wachstum und Saccharoseverwertung durch *G. oxydans inv-term-fdh* in YS-Medium mit 110 mM Saccharose. Der Stamm trug das Plasmid pBBR1p264-*inv1417\_term\_p264-fdhSCL*, auf dem die Terminationssequenz der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase (*gox0265*) hinter das Gen *inv1417* kloniert wurde. Das Experiment wurde zweimal repliziert. Die dadurch berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben. Dargestellt sind die mittels HPLC ermittelten Konzentrationen von Saccharose (○), 5-KF (●), Fruktose (□) und Glukose (■).

### 3.4.2 Identifizierung von *Gluconobacter* Wildtyp-Stämmen mit FDH-Aktivität

Als eine erste Alternative wurden verschiedene *Gluconobacter*-Stämme auf das natürliche Vorhandensein der FDH-kodierenden Gene *fdhS*, *fdhC* und *fdhL* untersucht. Ein Überblick über Stämme, die Saccharose-spaltende Enzyme tragen kann Kapitel 3.1.2 entnommen werden. Hintergrund dieser Analyse war, dass die Expression eines Gens/Genclusters Plasmid-vermittelt erfolgen kann, sobald entweder *inv1417* oder *fdhSCL* chromosomal in einem Organismus vorlagen. Um eine Vorauswahl zu treffen, wurden verschiedene *Gluconobacter*-Stämme bioinformatisch mit Hilfe von Blast-Analysen untersucht. Als Modell wurde das *fdhSCL*-Gencluster (GenBank: AB728565.1) aus *G. japonicus* NBRC 3260 (Kawai et al. 2013) verwendet. Bei dieser Analyse konnte das *fdh* Operon in den Genomen der Stämme *G. frateurii* NBRC 101659,

*G. japonicus* LMG 1281 und LMG 26773 sowie *G. albidus* LMG 1768, nicht aber in *G. japonicus* LMG 1417 und *G. oxydans* 621H identifiziert werden (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Die *fdhSCL*-positiven Stämme *G. albidus* LMG 1768, *G. japonicus* LMG 1281 und *G. japonicus* LMG 26773 wurden anschließend für 30 h in YM-Medium kultiviert, geerntet und gewaschen und anschließend die Aktivität der FDH an ganzen Zellen bestimmt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines photometrischen Tests (vgl. Kapitel 2.5.5). Daraus ging hervor, dass alle drei Stämme geringe FDH-Aktivitäten mit Werten von 50 - 89 mU/mg Gesamtzellprotein aufwiesen (Abb. 24), was für eine effiziente 5-KF-Produktion vermutlich noch nicht ausreichte. Als Kontrolle des Tests wurde auch die FDH-Aktivität des Stammes *G. oxydans* 621H ermittelt, der unter den gleichen Bedingungen keine Aktivität aufwies. Dies stimmte mit den bioinformatischen Ergebnissen überein, nach denen das *fdhSCL*-Gencluster nicht im Genom von *G. oxydans* 621H kodiert ist.



**Abbildung 24:** Photometrische Analyse der FDH-Aktivität in *Gluconobacter*-Stämmen. Die Durchführung erfolgte an ganzen Zellen mit Fruktose als Substrat. Als Elektronenakzeptoren wurden 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS eingesetzt. Die Reduktion von DCPIP wurde anhand der Abnahme der Absorption bei 600 nm gemessen. Die Oxidation von 1,0  $\mu$ mol Fruktose pro min pro mg Gesamtprotein ist hier als Unit (U) der Proteinaktivität angegeben.

Die Identifizierung eines Saccharose-spaltenden Enzyms in *G. japonicus* LMG 26773 (vgl. Kapitel 3.1.2) ermöglichte es, die geringe FDH-Aktivität des Wildtyp-Stammes durch eine Transformation des Plasmids pBBR1p264-*fdhSCL*-ST (Siemen et al. 2018) zu optimieren (Abb. 24). Die Korrektheit der auf Selektivagarplatten gewachsenen Klone wurde mittels Kolonie-PCR und anschließender Sequenzierung verifiziert. Der so erstellte Stamm *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* wurde erneut

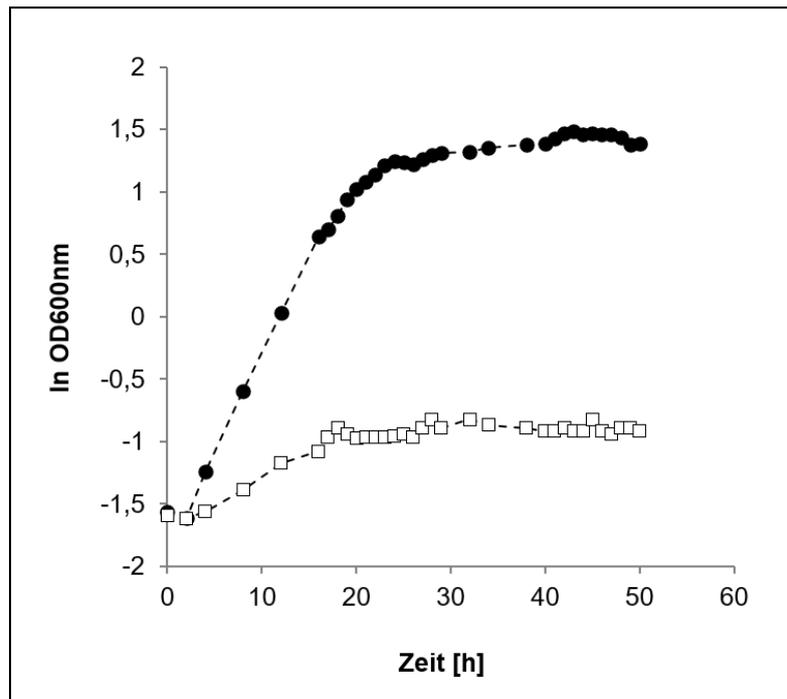
photometrisch analysiert und erreichte mit  $1100 \pm 59$  mU/mg Gesamtzellprotein eine deutlich gesteigerte FDH-Aktivität (Abb. 24). Im direkten Vergleich überstieg diese sogar die Aktivität des bisherigen Produktionsstammes *G. oxydans fdh* (Siemen et al. 2018) mit einem Wert von  $726 \pm 10$  mU/mg Gesamtzellprotein (Abb. 24). *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* konnte daher durch die natürliche Fähigkeit zur Hydrolyse von Saccharose und die hohe FDH-Aktivität als potentieller 5-KF-Produzent identifiziert werden.

### **3.4.3 Produktion von 5-KF durch *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281**

Im nächsten Schritt wurde die Möglichkeit zur Synthese von 5-KF aus Saccharose durch *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* untersucht und die maximale Produktmenge bestimmt. *G. japonicus* LMG 26773 war als potentieller Produktionsorganismus aus industrieller Sicht besonders interessant, da er aufgrund der chromosomal kodierten Gene *inv26773* und *fdhSCL* als unmodifizierter Wildtyp-Stamm eine antibiotikafreie 5-KF-Synthese ermöglichen könnte. Zusätzlich wies auch *G. japonicus* LMG 1281 das *fdhSCL*-Gencluster im Genom auf und erreichte bei der photometrischen Ermittlung der FDH-Aktivität mit  $89 \pm 4$  mU/mg Gesamtzellprotein etwas höhere Werte als *G. japonicus* LMG 26773 (vgl. Abb. 24). Durch den Einsatz einer Plasmid-vermittelten heterologen Produktion der Invertase<sup>1417</sup> sollte auch dieser Stamm als potentieller 5-KF-Produktionsorganismus getestet werden.

#### **3.4.3.1 *G. japonicus* LMG 26773 als natürlicher 5-KF-Produzent ausgehend von Saccharose**

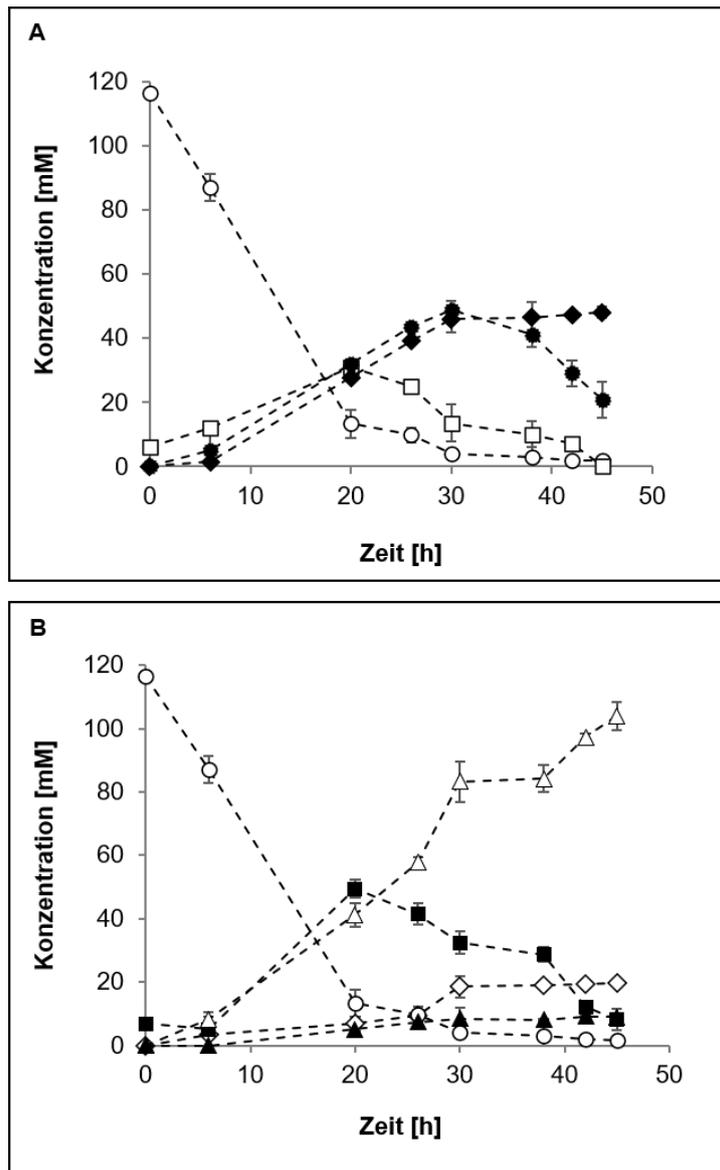
Die Effizienz der 5-KF-Produktion durch den Wildtyp-Stamm *G. japonicus* LMG 26773 wurde bei einer Kultivierung in YS-Medium mit 118 mM Saccharose ermittelt. Über einen Zeitraum von 52 h wurde das Wachstum anhand der Zunahme der optischen Dichte bestimmt. Dabei wurde eine Wachstumsrate von  $0,13 \text{ h}^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 5,2 h in der exponentielle Wachstumsphase berechnet (Abb. 25). Die finale optische Dichte betrug 2,51. Als Kontrolle wurde *G. oxydans* ebenfalls in Saccharose-haltigem Medium kultiviert. Da dieser keine Enzyme für die Hydrolyse von Saccharose besaß, konnte nur eine geringe Zunahme der Zelldichte ermittelt werden, die auf das Vorhandensein komplexer Medienbestandteile (6 g/L Hefeextrakt) zurückzuführen war (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Wachstumsverlauf von *G. japonicus* LMG 26773 mit Saccharose als Substrat. Dargestellt ist der Wachstumsverlauf für die Stämme *G. japonicus* LMG 26773 (●) und *G. oxydans* (□) als Kontrolle.

Neben der optischen Dichte wurden Proben des Kulturüberstandes von *G. japonicus* LMG 26773 entnommen und mit Hilfe der HPLC analysiert. Aus den gewonnenen Daten ergab sich, dass in einem Zeitraum von 30 h 116 mM Saccharose vollständig hydrolysiert werden konnten (Abb. 26). Die aus der Saccharosespaltung resultierenden Glukoseeinheiten wurden primär an der Cytoplasmamembran über das Intermediat Glukonat zu 2- und 5-Ketoglukonat oxidiert (Abb. 26 B). Ein Teil der Glukose wurde zusätzlich in das Cytoplasma aufgenommen, wo nach Verstoffwechselung über den oxidativen Pentose-Phosphatweg Acetat als Endprodukt generiert wurde (Abb. 26 B). Die resultierende Fruktose wurde teilweise zu 5-KF oxidiert (Abb. 26 A). Die maximale Konzentration lag bei 45,7 mM nach 30 h. Im weiteren Verlauf des Experimentes nahm die Menge an 5-KF im Medium jedoch wieder bis zu einer Konzentration von 21 mM ab. Zudem gingen 46 mM der aus der Saccharosespaltung entstandenen Fruktoseeinheiten durch die Synthese des Polyfruktans Levan für die 5-KF-Produktion verloren (Abb. 26 A). Levan entstand durch die Transfruktosylierungsreaktion der Levansucrase KXV40946.1, die mit Hilfe von Blastp-Analysen bioinformatisch im Genom von *G. japonicus* LMG 26773 identifiziert werden konnte.

Trotz der Abnahme von 5-KF in der späten Wachstumsphase und der Bildung des Nebenproduktes Levan, lag mit *G. japonicus* LMG 26773 ein erstes Ein-Stamm-System zur Produktion von 5-KF aus Saccharose vor. Der unveränderte Wildtyp-Stamm ermöglichte mit einer Effizienz von 40 % zudem die erste biotechnologische und antibiotikafreie Produktion von 5-KF aus Saccharose.



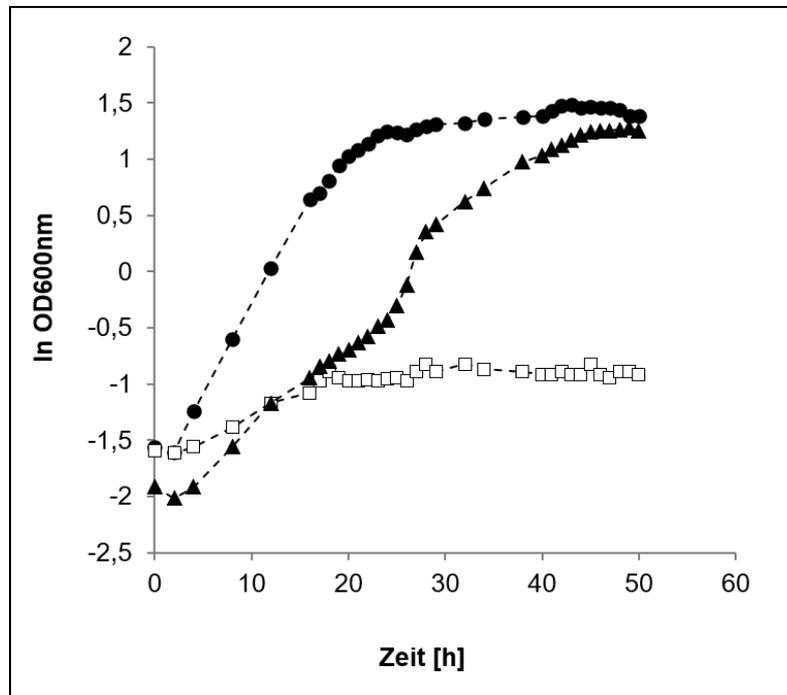
**Abbildung 26:** 5-KF-Produktion im Wildtyp *G. japonicus* LMG 26773 aus Saccharose. A: Abnahme von Saccharose (○) mit dem resultierenden Fruktosemetabolismus, bestehend aus 5-KF (●), Fruktose (□) sowie den Fruktoseeinheiten aus Levan (◆). B: Glukosemetabolismus, mit Saccharose (○), Glukose (■), 2-Ketoglukonat (Δ), 5-Ketoglukonat (▲) und Acetat (◇).

### 3.4.3.2 Produktion von 5-KF aus Saccharose durch *G. japonicus* LMG 26773 *fdh*

Nachdem die FDH-Aktivität in *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* durch das Plasmid pBBR1p264-*fdhSCL-ST* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *G. japonicus* LMG 26773 deutlich erhöht werden konnte (vgl. Kapitel 3.4.2), war auch von einer besseren Effizienz der 5-KF-Produktion auszugehen. Um dies zu ermitteln, erfolgte eine Kultivierung beider Stämme im direkten Vergleich in YS-Medium mit 116 mM Saccharose. Zudem wurde geprüft, ob Fruktoseeinheiten durch *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* zum Nebenprodukt Levan umgesetzt und ein Abbau von 5-KF detektiert werden konnte.

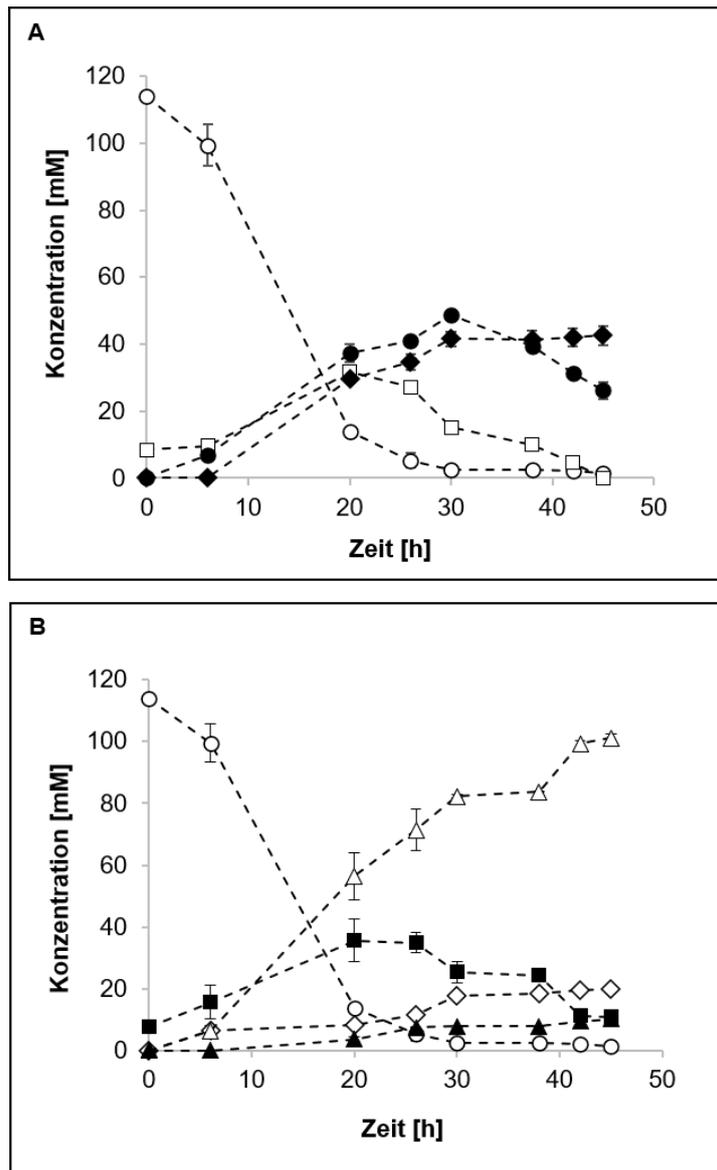
Bei der Betrachtung des Wachstumsverlaufs über die optische Dichte konnten in der Kultivierung von *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* zwei Wachstumsphasen detektiert werden, womit Unterschiede zum Wachstum des Wildtyp-Stammes vorlagen (Abb. 27). In der ersten Wachstumsphase (6 - 30

h) konnte eine Wachstumsrate von  $0,10 \text{ h}^{-1}$  mit einer Verdopplungszeit von  $7,1 \text{ h}$  detektiert werden. Die Wachstumsrate verlangsamte sich in der zweiten Phase (30 - 50 h) und erreichte hier einen Wert von  $0,02 \text{ h}^{-1}$  (Abb. 27). Die finale optische Dichte betrug 2,5, was der optischen Dichte des Wildtyp-Stammes unter den gleichen Kultivierungsbedingungen entsprach.



**Abbildung 27:** Wachstum von *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* in YS-Medium. Dargestellt ist der Wachstumsverlauf als natürlicher Logarithmus der optischen Dichte bei 600 nm für die Stämme *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* (▲) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (●) *G. japonicus* LMG 26773 und *G. oxydans* (□) als Kontrolle.

Die HPLC-Analyse der Kultivierung von *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* in Saccharose-haltigem Medium wies keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen des Wildtyps auf (Abb. 28). Die Hydrolyse von 115 mM Saccharose konnte erneut innerhalb von 30 h abgeschlossen werden. Aus der resultierenden Glukose wurden 2- und 5-Ketoglukonat sowie Acetat gebildet (Abb. 28 B). Trotz erfolgter Steigerung der FDH-Aktivität durch das zusätzliche Plasmid-vermittelte *fdhSCL*-Gencluster, konnte die Menge an gebildeter 5-KF im Vergleich zum Wildtyp-Stamm nicht signifikant erhöht werden (Abb. 28 A, im Vergleich zu Abb. 26 A). Nach 30 h wurde eine maximale Konzentration von 49 mM 5-KF nachgewiesen. Aus der HPLC-Analyse ging erneut hervor, dass es zu einer Reduktion des Produktes im Verlauf der Kultivierung kam (Abb. 28 A). Dies konnte vor allem in der zweiten Wachstumsphase verzeichnet werden, was darauf hindeutete, dass das Produkt in dieser metabolisiert wurde (vgl. Kapitel 4.7.4). Am Ende des Versuches konnten nur noch 26 mM 5-KF im Medienüberstand detektiert werden, was einer Reduktion von 53 % entsprach. Als ein weiterer Grund für die geringe Produktmenge konnte erneut die Bildung des Nebenproduktes Levan identifiziert werden (Abb. 28 A). Durch die Levansucrase-vermittelte Transfruktosylierungsreaktion gingen in diesem Experiment 42 mM aller verfügbaren Fruktoseeinheiten für die Oxidation zu 5-KF verloren.



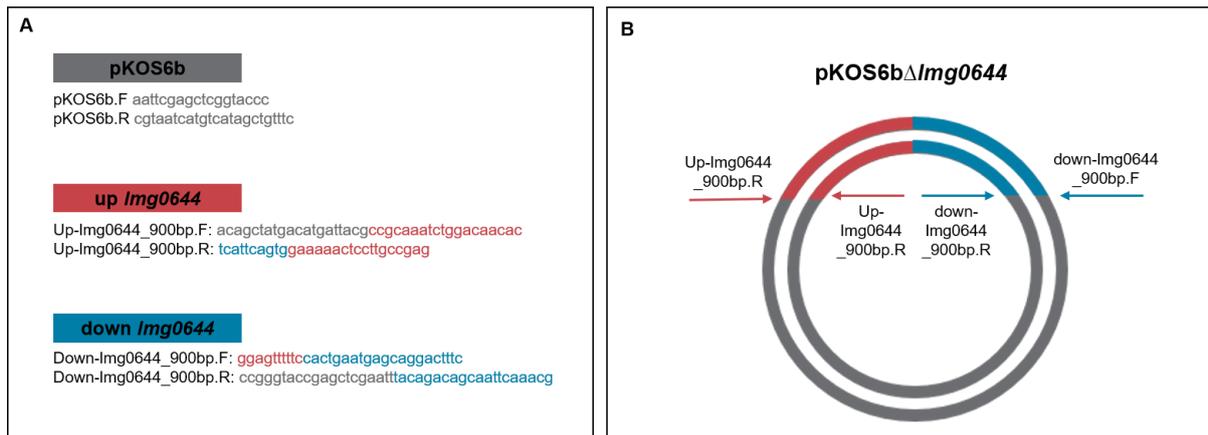
**Abbildung 28:** 5-KF-Produktion aus Saccharose durch *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* kultiviert in YS-Medium. Dargestellt ist die Metabolisierung von Fruktose (A): mit Saccharose (○), 5-KF (●), Fruktose (□) sowie Fruktoseeinheiten aus Levan (◆). Metabolisierung von Glukose (B): Glukose (■), 2-Ketoglukonat (Δ), 5-Ketoglukonat (▲) und Acetat (◇). Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Hier dargestellt sind die Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen.

### 3.4.3.3 Optimierung der 5-KF-Produktion in *G. japonicus* LMG 26773 durch Gendeletion reduzierender Enzyme

Der starke 5-KF-Abbau und die Bildung des Nebenproduktes Levan führten dazu, dass *G. japonicus* LMG 26773 nicht ohne weitere Modifizierungen als industriell geeignetes Ein-Stamm-System eingesetzt werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Enzyme identifiziert, die potentiell eine Reduktion von 5-KF zu Fruktose (vgl. Kapitel 4.7.4) katalysieren könnten. Um dem Abbau entgegenzuwirken, sollten anschließend Deletionen der zugehörigen Gene erfolgen. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, lag das Genom des Stammes zwar vollständig sequenziert vor, dennoch fehlten biochemische Analysen der Enzyme des Organismus. Die Suche nach potentiellen 5-KF-reduzierenden Enzymen erfolgte daher in dem gut beschriebenen, nah

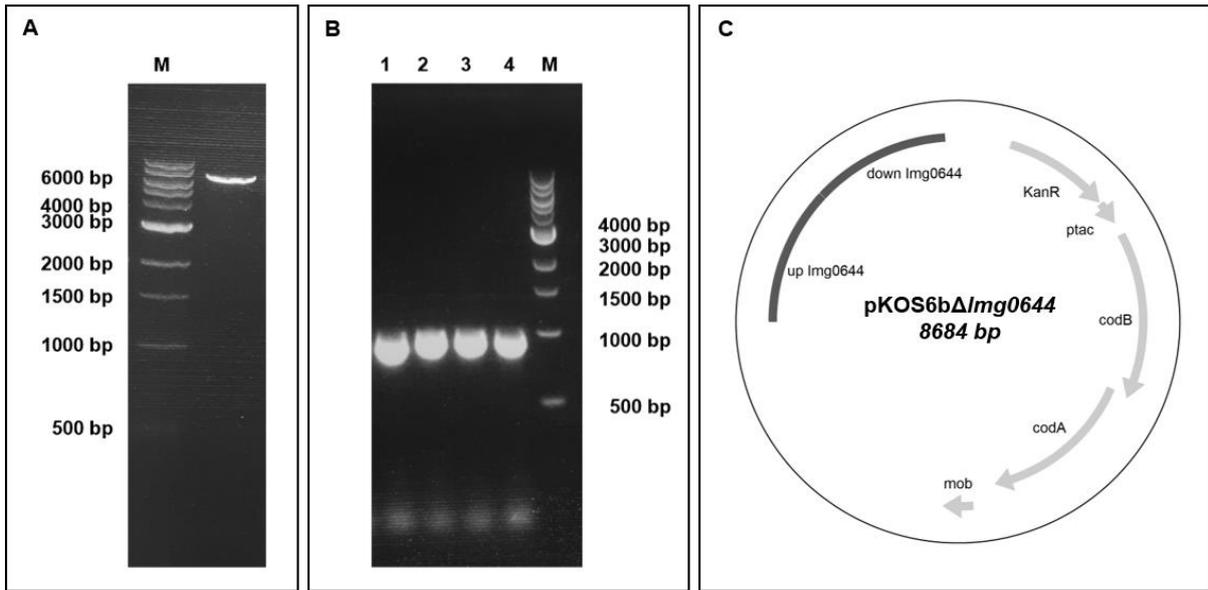




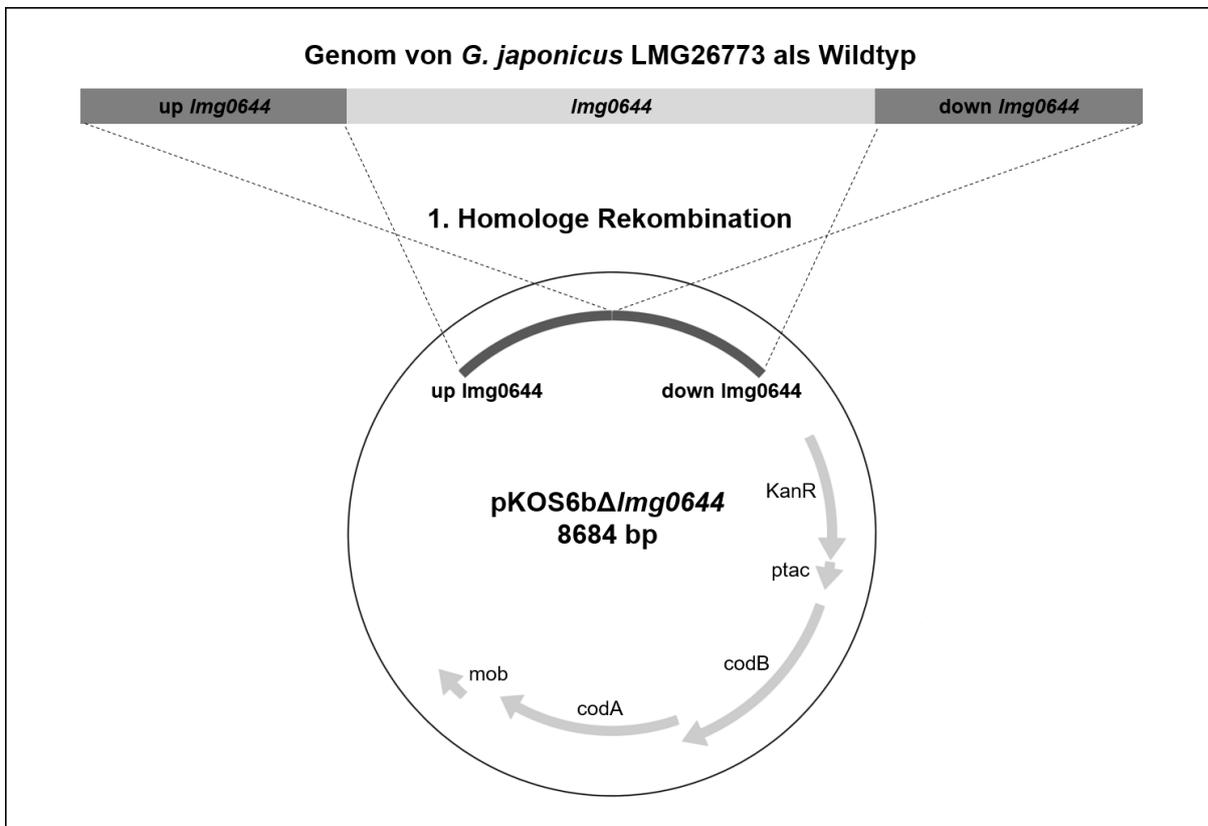


**Abbildung 31:** Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6bΔ*Img0644* bei Verwendung des NEBuilder Assembly Tools. A: Die Primer wurden mit Hilfe des Tools generiert und waren so konstruiert, dass komplementäre Überhänge zum jeweils nächsten Fragment bei der Amplifizierung entstanden. Dadurch wurde die Verbindung der einzelnen Fragmente in der richtigen Reihenfolge gewährleistet. Die Farben der Sequenzen geben die Überhänge zum jeweiligen Fragment an. Grau: pKOS6b-Vektorrückgrat, rot: Region mit einer Größe von 900bp stromaufwärts von *Img0644*, blau: Region mit einer Größe von 900bp stromabwärts des Zielgens. Die Primer binden an den mit Pfeilen markierten Stellen in Teil B der Abbildung. B: Schematische Darstellung des Deletionsvektor pKOS6bΔ*Img0644*. Anhand der Farben können die einzelnen Fragmente zugeordnet werden.

Die Amplifizierung der benötigten DNA-Fragmente war zu Beginn nur teilweise erfolgreich. Unter Verwendung der Primer pKOS6b.F/R konnte ein Fragment mit einer dem Vektorrückgrat entsprechenden Größe von 6689 bp generiert werden (Abb. 32 A). Die flankierenden Regionen des Gens *Img0644* (1000 bp) konnten trotz mehrfacher Wiederholung der PCR unter variierenden Bedingungen nicht amplifiziert werden. Durch eine Verkürzung dieser Bereiche auf eine Länge von 900 bp, mit der bereits Gendelektionen stattfinden konnten (Kosciow et al. 2016), war eine Amplifizierung unter Verwendung der Primer Up-*Img0644*\_900bp.F/R und Down-*Img0644*\_900bp.F/R schließlich erfolgreich (Abb. 32 B). Nach einem Aufreinigungsschritt der DNA-Stücke erfolgte eine Assemblierung über die komplementären Überhänge mit Hilfe des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes. Das daraus resultierende Plasmid pKOS6bΔ*Img0644* (Abb. 32 C) wurde erst in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen und anschließend in *G. japonicus* LMG 26773 eingebracht. Eine Selektion der Transformanten erfolgte auf Kanamycin-haltigen Agarplatten. Das Plasmid pKOS6bΔ*Img0644* war im Empfängerorganismus nicht replizierbar, weshalb ausschließlich Zellen auf dem Selektionsagarplatten wuchsen, die den Vektor über eine erste homologe Rekombination vollständig in das Genom integrieren konnten (Abb. 33).

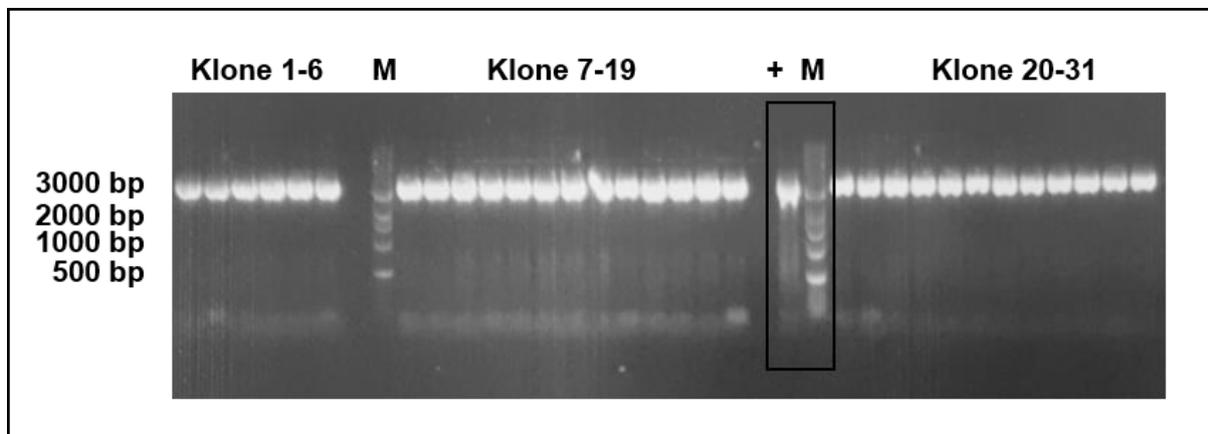


**Abbildung 32:** Klonierungsstrategie zur Generierung des Vektors pKOS6bΔ*Img0644*. A: Agarosegel des pKOS6b-Fragments mit einer Größe von 6689 bp. B: Amplifizierung der 900 bp großen Fragmente stromaufwärts (Spur 1 und 2) und stromabwärts (Spur 3 und 4) des Gens *Img0644* unter Einsatz der Primer Up-*Img0644*\_900bp.F/R und Down-*Img0644*\_900bp.F/R. C: Plasmid pKOS6bΔ*Img0644* für die Deletion des Gens *Img0644* in *G. japonicus* LMG 26773. Darauf befinden sich neben den flankierenden Bereichen up-*Img0644* und down-*Img0644* zudem eine Kanamycin-Resistenzkassette (Kan), ein tac-Promotor (ptac), die Gensequenzen der Cytosin-Deaminase (*codA*) und der Cytosin-Permease (*codB*) sowie ein Mobilitätsgen (*mob*).



**Abbildung 33:** Schematische Darstellung der ersten homologen Rekombination. Dargestellt ist die Integration des Deletionsvektors pKOS6bΔ*Img0644* in die genomische DNA von *G. japonicus* LMG 26773 über die up- und downstream Bereiche des Gens *Img0644*.

Der Nachweis der ersten homologen Rekombination erfolgte durch eine Kolonie-PCR, mit der das Vorhandensein des im Vektorrückgrat befindlichen Gens *codA* überprüft wurde. Nach Verifizierung wurde der Vorgang der zweiten homologen Rekombination durchgeführt. Dafür wurde eine Einzelkolonie in frischem YM-Medium mit Cefoxitin über Nacht kultiviert und anschließend auf 5-Fluorocytosin-Selektionsplatten (60 µg/ml FC) ausplattiert. 5-Fluorocytosin konnte durch die heterolog produzierte Cytosin-Deaminase (*CodA*) und Cytosin-Permease (*CodB*), deren Gene als Vektorrückgrat von pKOS6bΔ*Img0644* ebenfalls in das Genom integriert wurden, zu toxischem 5-Fluoruracil (5-FU) umgewandelt werden (Kostner et al. 2013). Nur Zellen, in denen durch eine zweite homologe Rekombination ein spontaner Verlust dieser Gene aus der genomischen DNA erfolgte, konnten auf dem Nährboden überleben. Bei diesem Vorgang entstanden daher entweder Wildtyp-Revertanten oder die gewünschte Mutante unter Austausch des Zielgens mit den fusionierten Genflanken des Deletionsvektors. Um zwischen Revertante und gewünschter Mutante unterscheiden zu können, war eine Kolonie-PCR zum Nachweis des Gens *Img0644* notwendig. Unter Einsatz der Primer Up-*Img0644\_900bp.F* und Down-*Img0644\_900bp.R* wurde bei einer Deletion ein Fragment von 1800 bp erwartet. Lag der Wildtyp vor, betrug die Größe des Amplifikats 2941 bp. Die Analyse ergab, dass unter allen 117 untersuchten Klonen keine Mutante vorlag. Alle Fragmente, die bei der Überprüfung amplifiziert wurden, wiesen eine Größe von 3000 bp auf (Abb. 34). Da ein Fragment mit der gleichen Größe ebenfalls in der mitgeführten Kontrolle aus genomischer DNA des Wildtyps *G. japonicus* LMG 26773 detektiert werden konnte, lagen in dieser Analyse lediglich Wildtyp-Revertanten vor.



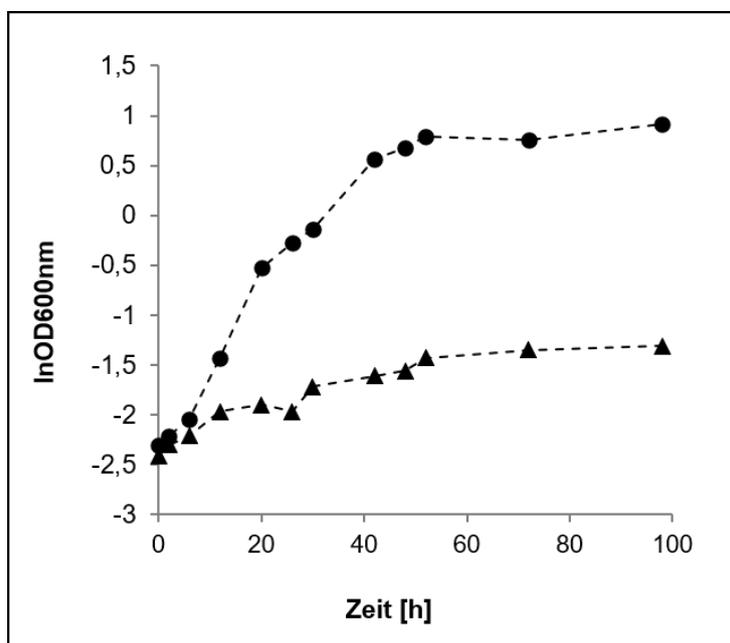
**Abbildung 34:** Nachweis der 2. Rekombination zur Deletion von *Img0644*. Das Agarosebild von 31 aus insgesamt 117 getesteten Klonen ist dargestellt. Alle Banden wiesen eine vergleichbare Größe zur Positivkontrolle (+) auf, bei der genomische DNA des Wildtyp-Stammes *G. japonicus* LMG 26773 eingesetzt wurde. Als Marker (M) wurde der 1 kb DNA-Marker der Firma NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) eingesetzt.

Eine Deletion des Gens *Img0644* und damit die Inhibierung des 5-KF-Abbaus durch die 5-KF-Reduktase KXV40663.1 konnte nicht erfolgen. Zur Generierung eines geeigneten Produktionssystems aus *G. japonicus* LMG 26773 wäre neben *Img0644* noch die Deletion weiterer Gene (*Img1432* und das für die Levansucrase KXV40946.1 kodierende Gen) erforderlich, weshalb Optimierungen dieses Stammes im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht fortgeführt wurden.

### 3.4.3.4 *G. japonicus* LMG 1281 *inv* als potentieller 5-KF-Produzent

Aufgrund der Identifizierung des *fdhSCL*-Genclusters im Genom von *G. japonicus* LMG 1281 (vgl. Kapitel 3.4.2), wurde auch dieser Stamm als möglicher Produktionsorganismus für 5-KF getestet. Mit einer FDH-Aktivität von  $89 \pm 4$  mU/mg Gesamtzellprotein konnte für *G. japonicus* LMG 1281 im Vergleich zu *G. japonicus* LMG 26773 sogar eine geringfügig höhere Aktivität bestimmt werden (vgl. Kapitel 3.4.2, Abb. 24). Da im Genom des Stammes jedoch keine Gene identifiziert werden konnten, die für Invertasen oder Sucrasen kodierten, war der unveränderte Wildtyp-Stamm nicht zur Spaltung von Saccharose befähigt (vgl. Kapitel 3.1.2). Um die Hydrolyse des Disaccharids zu ermöglichen, wurde das Plasmid pBBR1p264-*inv*1417 in *G. japonicus* LMG 1281 transformiert und *G. japonicus* LMG 1281 *inv* anschließend als potentielles Ein-Stamm-System getestet.

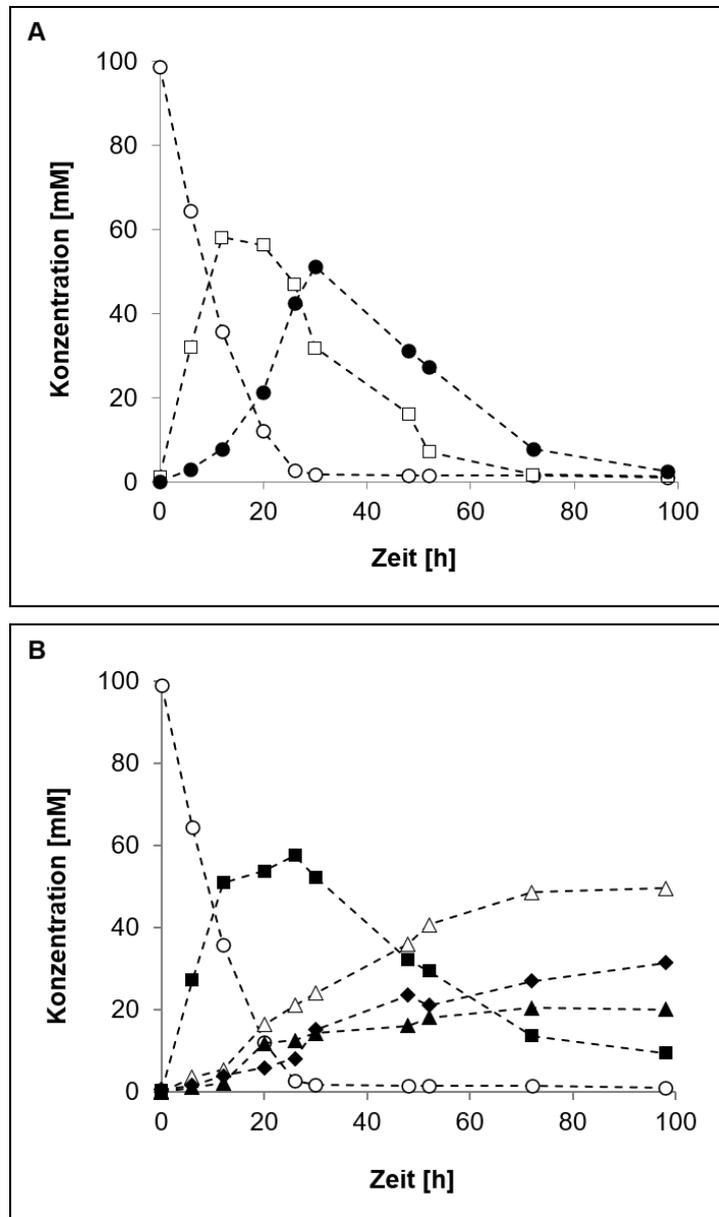
Ein Wachstumsvergleich anhand der optischen Dichte erfolgte zwischen dem Wildtyp-Stamm *G. japonicus* LMG 1281 und *G. japonicus* LMG 1281 *inv* in Saccharose-haltigem Medium mit 100 mM Substrat (Abb. 35). Lediglich für den plasmidtragenden Stamm konnte eine Zunahme der optischen Dichte ermittelt werden. Dies deutete darauf hin, dass Saccharose durch die heterologe Produktion der Invertase1417 gespalten und die resultierenden Glukoseeinheiten als C-Quelle genutzt werden konnten. Die Wachstumsrate von *G. japonicus* LMG 1281 *inv* in der exponentiellen Phase lag bei  $0,1 \text{ h}^{-1}$  mit einer entsprechenden Verdopplungszeit von 5,5 h. Final konnte eine optische Dichte von 2,5 erreicht werden.



**Abbildung 35:** Wachstum von *G. japonicus* LMG 1281 *inv* in YS-Medium mit 100 mM Saccharose. Dargestellt ist der Wachstumsverlauf von *G. japonicus* LMG 1281 *inv* (●) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *G. japonicus* LMG 1281 (▲).

Die Analyse mittels HPLC ergab, dass 100 mM Saccharose nach 30 h vollständig hydrolysiert wurden (Abb. 36). Die freigesetzten Fruktoseeinheiten konnten über die FDH zu 5-KF oxidiert werden. Nach einer Kultivierungsdauer von 30 h lag eine maximale 5-KF-Konzentration von 51 mM

im Medium vor. Anschließend fand eine Reduktion des Produktes statt, obwohl weitere Fruktoseeinheiten im Kulturüberstand vorlagen und nachgewiesen wurden (Abb. 36 A). Glukose, die aus der Spaltung der Saccharose entstand, wurde von *G. japonicus* LMG 1281 *inv* zu 2- und 5- Ketoglukonat (50 bzw. 20 mM) sowie 30 mM Acetat umgesetzt (Abb. 36 B).



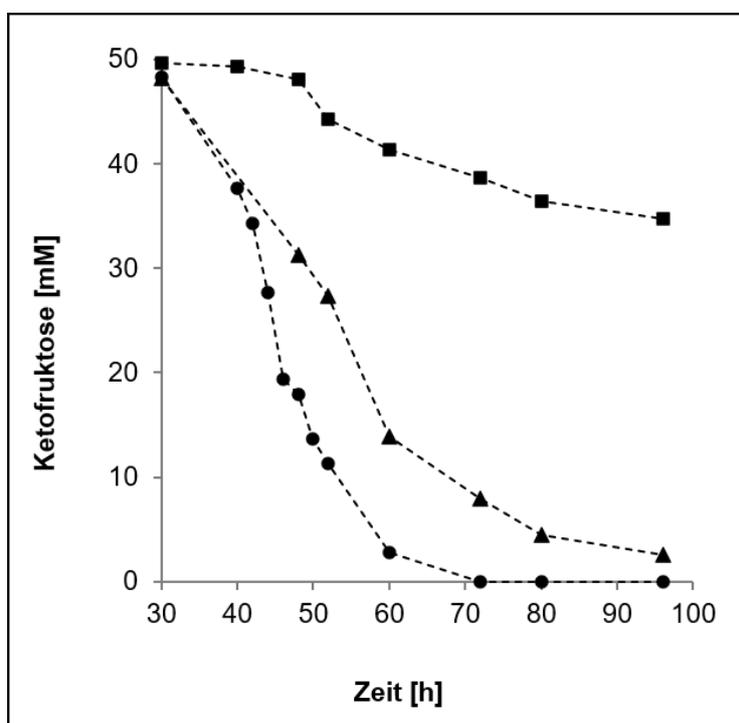
**Abbildung 36:** 5-KF-Produktion durch *G. japonicus* 1281 *inv* aus 100 mM Saccharose. A: Fruktosemetabolismus: Abnahme von Saccharose (○) sowie Zunahme von 5-KF (●) und Fruktose (□). B: Glukosemetabolismus: Glukose (■) sowie die Produkte 2-Ketoglukonat (Δ), 5-Ketoglukonat (▲), Acetat (◆).

Mit *G. japonicus* LMG 1281 *inv* konnte ein weiteres potentielles Ein-Stamm-System zur 5-KF-Produktion aus Saccharose erstellt werden. Mit einer Effizienz von 51 % war der Stamm jedoch noch nicht für eine Produktion im industriellen Maßstab geeignet. Neben der geringen Ausbeute lag dies vor allem an dem starken Abbau von 5-KF nach einer Kultivierungsdauer von 30 h.

### 3.4.4 Abbau von 5-KF in potentiellen Produktionsstämmen

Die Reduktion von 5-KF in den analysierten *Gluconobacter*-Stämmen (vgl. Kapitel 3.4.3) erschwerte die Generierung eines industriell geeigneten Expressionssystems. Um den optimalen Stamm als Grundlage für den 5-KF-Produktionsprozess zu identifizieren, sollte auch der bisherige Produktionsorganismus *G. oxydans* auf die Möglichkeit des 5-KF-Abbaus untersucht werden. Dies war notwendig, da die Gene *Img0644* und *Img1432* aus *G. japonicus* LMG 26773, die für die 5-KF-Reduktasen kodierten, auch im Genom von *G. oxydans* vorlagen (*gox0644* und *gox1432*, vgl. Kapitel 3.4.3.3). Zudem zeigte die Charakterisierung der zugehörigen, aufgereinigten Proteine Gox0644 und Gox1432, dass diese hohen Aktivitäten für die Reduktion des Substrats 5-KF aufwiesen (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.).

Um den Verlauf des 5-KF-Abbaus vergleichen zu können, wurden die Konzentrationen von 5-KF während der Kultivierung der Stämme *G. japonicus* LMG 26773, *G. japonicus* LMG 1281 und *G. oxydans fdh* betrachtet (Abb. 37).



**Abbildung 37:** 5-KF-Abbau in verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen. Die Abnahme der Konzentration von 5-KF wurde in den Stämmen *G. japonicus* LMG 26773 (●), *G. japonicus* LMG 1281 (▲) und *G. oxydans fdh* (■) mittels HPLC bestimmt.

Die Wildtyp-Stämme *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281 wiesen in dieser Analyse eine deutlich stärkere 5-KF-Reduktion auf, als *G. oxydans fdh* (Abb. 37). Zwischen einer Kultivierungsdauer von 30 - 50 h wurden durch *G. japonicus* LMG 26773 35 mM und durch *G. japonicus* LMG 1281 20 mM 5-KF abgebaut. Im Vergleich zeigte *G. oxydans fdh* in diesem Zeitraum nur eine geringe Abnahme der 5-KF-Konzentration von 5 mM (Abb. 37). Die Auswirkung der 5-KF-Reduktasen wurde über den gesamten Produktionszeitraum von 96 h noch deutlicher. Der stärkste Abbau konnte in der Kultivierung von *G. japonicus* LMG 26773 detektiert werden,

durch den 45 mM 5-KF in nur 30 h reduziert wurden. Das Produkt wurde außerdem im Verlauf des Experimentes vollständig abgebaut. In *G. japonicus* LMG 1281 konnte eine Reduktion von 45 mM 5-KF entsprechend in 52 h detektiert werden. Zum Ende des Experimentes nach 96 h waren von den ursprünglichen 48 mM 5-KF noch 3 mM nachweisbar. Im direkten Vergleich lag in den Kulturüberständen von *G. oxydans fdh* auch nach einer Kultivierungsdauer von 96 h lediglich eine Abnahme von 15 mM 5-KF vor.

### **3.4.5 Genomintegration als alternativer Weg zur Generierung eines Ein-Stamm-Systems**

Die ersten Ein-Stamm-Systeme, basierend auf *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281, erlaubten zwar eine Produktion von 5-KF aus Saccharose, die Erträge waren für einen industriellen Prozess jedoch nicht ausreichend hoch. Neben einem starken Abbau von 5-KF gingen in Kultivierungen von *G. japonicus* LMG 26773 außerdem Fruktoseeinheiten durch die Bildung des Nebenproduktes Levan verloren, was die Produktausbeute weiter verringerte. *G. oxydans* wies hingegen in der stationären Phase nur eine sehr langsame und lediglich geringe 5-KF-Reduktion auf, weshalb sich dieser Stamm als Grundlage zur Generierung eines industriellen Produktionssystems besser eignete. Zudem besaß der Organismus keine Gene, die für Levansucrasen kodierten, sodass auch die Bildung des Nebenproduktes Levan ausgeschlossen werden konnte. Nicht zuletzt konnte *G. oxydans* bereits in verschiedenen Arbeiten erfolgreich als Produktionsorganismus für 5-KF eingesetzt werden (Siemen et al. 2018; Herweg et al. 2018).

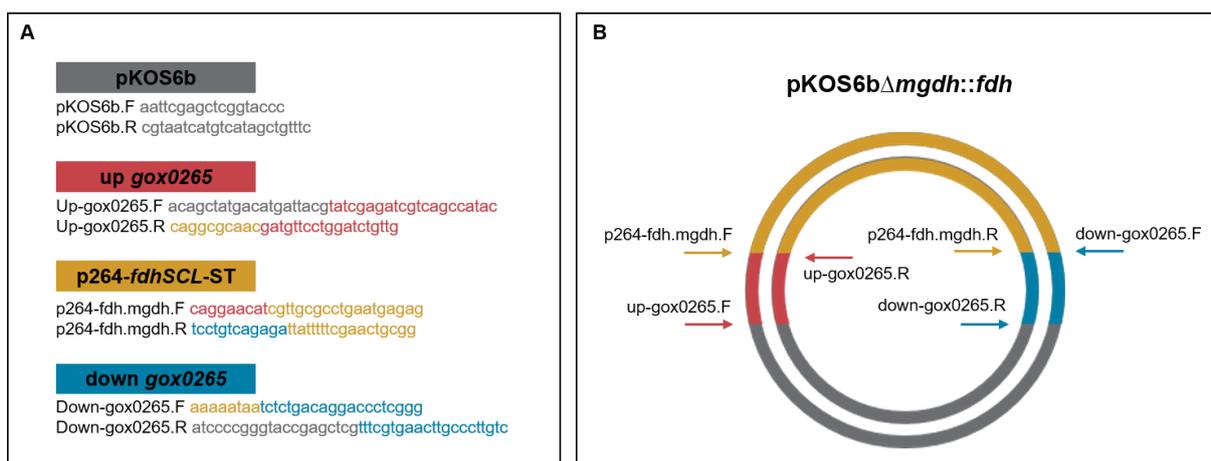
Um *G. oxydans* für die Synthese von 5-KF aus dem alternativen Substrat Saccharose nutzen zu können, mussten mehrere Eigenschaften beachtet werden. Das Disaccharid konnte zwar über Porine der äußeren Membran ins Periplasma des Stammes diffundieren, wurde dort aber aufgrund fehlender Gene, die für Invertasen oder Sucrasen kodierten, nicht in die Monosaccharide Glukose und Fruktose gespalten (vgl. Kapitel 3.2.5 und 4.2). Zusätzlich lag auch das *fdhSCL*-Gencluster nicht im Genom des Wildtyps vor. Da eine Plasmid-basierte heterologe Co-Produktion von Inv1417 und FDH nicht erfolgen konnte (vgl. Kapitel 3.4.1), war es für die Generierung eines Ein-Stamm-Systems mit *G. oxydans* als Produktionsorganismus notwendig, dieses Problem durch eine Genomintegration zu umgehen. Ziel dieses Vorhabens war es, ein Gen oder Gencluster chromosomal zu integrieren und das jeweils andere mit Hilfe eines Plasmids in den Organismus zu transformieren.

#### **3.4.5.1 Integration des *fdhSCL*-Genclusters ins Genom von *G. oxydans***

Für die geplante Genomintegration musste zuerst ein geeigneter Integrationsort gefunden werden. Dafür wurde berücksichtigt, dass in einer zweiten Förderungsphase des 5-KF-Forschungsvorhabens im Jahr 2021 der Einsatz einer Glukose-Isomerase in den finalen Produktionsprozess geplant war. Durch Integration eines solchen Enzyms könnten zukünftig, neben der aus der Saccharosespaltung resultierenden Fruktose, auch die Glukoseeinheiten für die Produktion von 5-KF verwendet und der Ertrag des Systems gesteigert werden. Ein detaillierte Beschreibung dieses Vorhabens kann in Kapitel 4.8.3 nachgelesen werden. Um mit dem in dieser

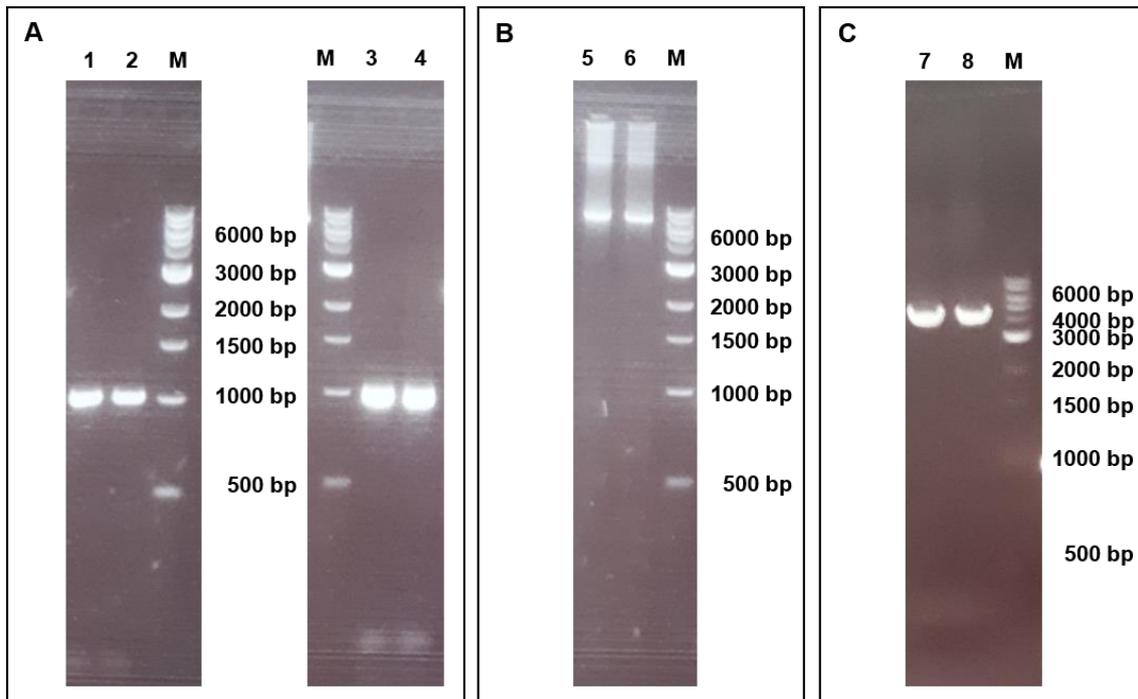
Arbeit generierten Stamm eine Grundlage für den Einsatz einer Glukose-Isomerase zu schaffen, war es notwendig, die Metabolisierung von Glukose in *G. oxydans* einzuschränken. Die Deletion von Genen, die das Monosaccharid verwerten konnten, war daher zielführend. Die Wahl des Integrationsortes fiel schließlich auf das Gen *gox0265*, welches für eine membrangebundene Glukose-Dehydrogenase (mGDH) in *G. oxydans* kodiert. Dieses Enzym oxidiert Glukose zu  $\delta$ -Glukonolaktone, welches dann periplasmatisch, entweder chemisch oder enzymatisch, durch eine Glukono- $\delta$ -Laktonease zu Glukonat hydrolysiert wird (Matsushita et al. 1980; Buchert und Viikari 1988; Shinagawa et al. 2009). Glukonat kann anschließend entweder cytoplasmatisch von der NADP-abhängigen Glukonat 5-Dehydrogenase Gox2187 zu 5-Ketoglukonat (Klasen et al. 1995; Rauch et al. 2010) oder periplasmatisch durch die membrangebundene Glukonat-Dehydrogenase (Gox1230–1232) zu 2-Ketoglukonat (Prust et al. 2005; Peters et al. 2013) oxidiert werden (vgl. Kapitel 4.7.3). Durch die Deletion von *gox0265* und die Integration von *fdhSCL* an gleicher Stelle im Genom, erfolgte zudem ein Austausch eines membrangebundenen Enzyms gegen die ebenfalls membranständige FDH.

Als Basis für das Deletionskonstrukt wurde erneut der pKOS6b-Vektor verwendet (Kostner et al. 2013). Die Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b $\Delta$ *mgdh::fdh*, der gleichzeitig die Integration des *fdhSCL*-Genclusters vermittelte, erfolgte durch eine Assemblierung. Dafür wurden das Vektorrückgrat, die flankierenden Bereiche stromaufwärts und stromabwärts des zu deletierenden Gens *gox0265* und zusätzlich das *fdhSCL*-Gencluster als Integrationsfragment benötigt (Abb. 38). Durch spezifische Oligonukleotide (Abb. 38) konnten die Amplifikate up-*gox0265* (Abb. 39 A, 1030 bp), down-*gox0265* (Abb. 39 A, 1030 bp), pKOS6b (Abb. 39 B, 6689 bp) und p264-*fdhSCL* (Abb. 39 C, 4280 bp) mit komplementären Überhängen generiert und unter Einsatz des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes in der richtigen Orientierung verknüpft werden (Abb. 38).



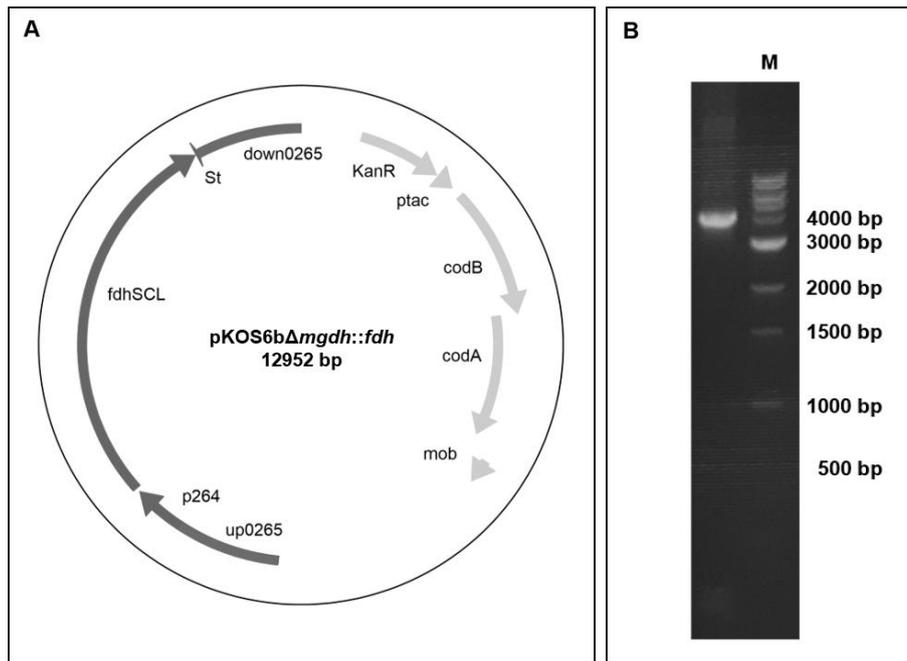
**Abbildung 38:** Schematische Darstellung der Konstruktion des Deletionsvektors pKOS6b $\Delta$ *mgdh::fdh*. A: Mittels NEBuilder Assembly Tool erstellte Primer, durch die alle Amplifikate mit komplementären Überhängen zum jeweils nächsten Fragment generiert wurden. Die Farben der Sequenzen geben die Überhänge zum jeweiligen Fragment an. Grau: pKOS6b-Vektorrückgrat, rot: upstream-Region (1000bp) von *gox0265*, blau: downstream-Region (1000 bp) von *gox0265* und gelb: Amplifikat p264-*fdhSCL*-strep. Die Primer binden an den mit Pfeilen markierten Stellen in Teil B der Abbildung. B: Vektor nach

Verknüpfung der Fragmente über die komplementären Überhänge mit Hilfe des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. Die Farben im Vektor können den jeweiligen Fragmenten zugeordnet werden.



**Abbildung 39:** PCR-Fragmente für die Konstruktion des Knockout-Vektors *pKOS6bΔmgdh::fdh*. A: Amplifizierung des stromaufwärts- und stromabwärts Bereiches von *gox0265*. Die Fragmente wurden unter Verwendung der Primer Up-*gox0265.F*/Up-*gox0265.R* (Spur 1, 2) und Down-*gox0265.F*/Down-*gox0265.R* (Spur 3, 4) generiert und wiesen die erwartete Fragmentgröße von 1030 bp auf. B: Amplifizierung des Vektorrückgrats *pKOS6b* (Spur 5, 6) mit einer Größe von 6689 bp. C: Unter Einsatz der Primer *p264-fdh.mgdh.F*/*p264-fdh.mgdh.R* konnte das *fdhSCL*-Gencluster mit starkem konstitutiven Promotor *p264* amplifiziert werden. Die Größe des Fragmentes betrug 4280 bp. M: 1 kb Marker (NEB).

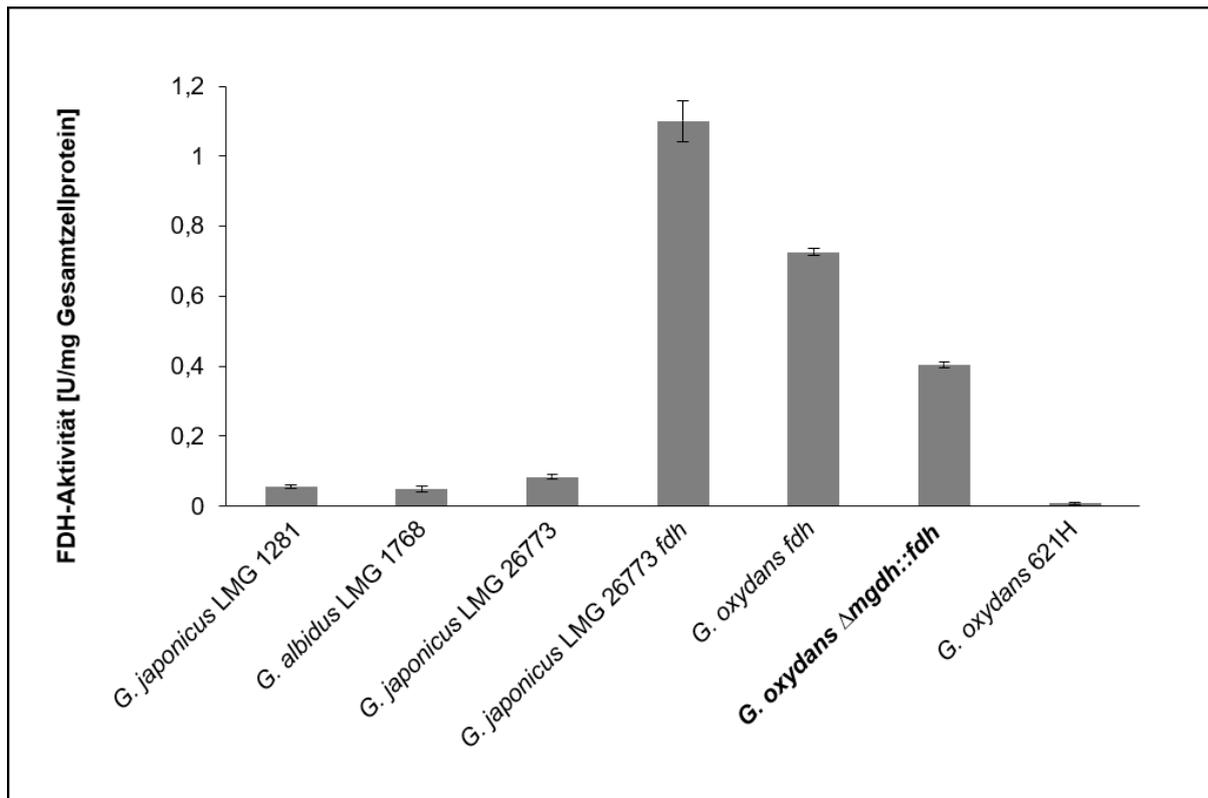
Das resultierende Plasmid *pKOS6bΔmgdh::fdh* (Abb. 40 A) wurde in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transferiert, vervielfältigt und anschließend mittels Elektroporation in *G. oxydans* eingebracht. Der Vektor *pKOS6bΔmgdh::fdh* war in *G. oxydans* nicht replizierbar, weshalb ausschließlich Zellen auf Kanamycin-haltigem Agar wuchsen, die den Vektor über eine erste homologe Rekombination vollständig in das Genom integrieren konnten (vgl. Abb. 33). Gewachsene Einzelkolonien, in denen das im Vektorrückgrat befindliche Gen *codA* nachgewiesen wurde, konnten anschließend für den Vorgang der zweiten homologen Rekombination eingesetzt werden. Nach Kultivierung in YM-Medium über Nacht, erfolgte ein Ausplattierungsschritt auf selektiven Agarplatten, die 5-FC, aber kein Kanamycin beinhalten. Um zwischen Revertante und gewünschter Mutante unterscheiden zu können, wurde eine Kolonie-PCR zum Nachweis einer Integration des *fdhSCL*-Genclusters in *G. oxydans* durchgeführt. Dafür wurden die Primer *p264fdh-strep.for*/*p264fdh-strep.rev* eingesetzt, wodurch ein Klon mit einer passenden Fragmentgröße von 4200 bp identifiziert werden konnte (Abb. 40 B). Der entstandene Stamm *G. oxydans Δmgdh::fdh* wurde für weitere Versuche verwendet.



**Abbildung 40:** Generierung des Integrationsstammes *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$ . A: Deletions- bzw. Integrationsplasmid für die Konstruktion von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$ . Auf dem Vektor befinden sich neben den flankierenden Bereichen stromaufwärts und stromabwärts von *gox0265* und *p264-fdhSCL* außerdem eine Kanamycin-Resistenzkassette (Kan), der Replikationsursprung (rep), ein tac-Promotor (ptac), ein Mobilisierungsgen (mob) sowie die Gensequenzen der Cytosin-Deaminase (*codA*) und der Cytosin-Permease (*codB*). B: Nachweis einer Genomintegration des *fdhSCL*-Genclusters an der Stelle des Gens *gox0265*. Unter Verwendung der Primer *p264fdh-strep.for/p264fdh-strep.rev* konnte ein Fragment mit einer Größe von 4200 bp amplifiziert werden, das der berechneten Größe von *p264-fdhSCL-St* entsprach. M: 1 kb Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

### 3.4.5.2 FDH-Aktivität verschiedener *Gluconobacter*-Stämme im Vergleich

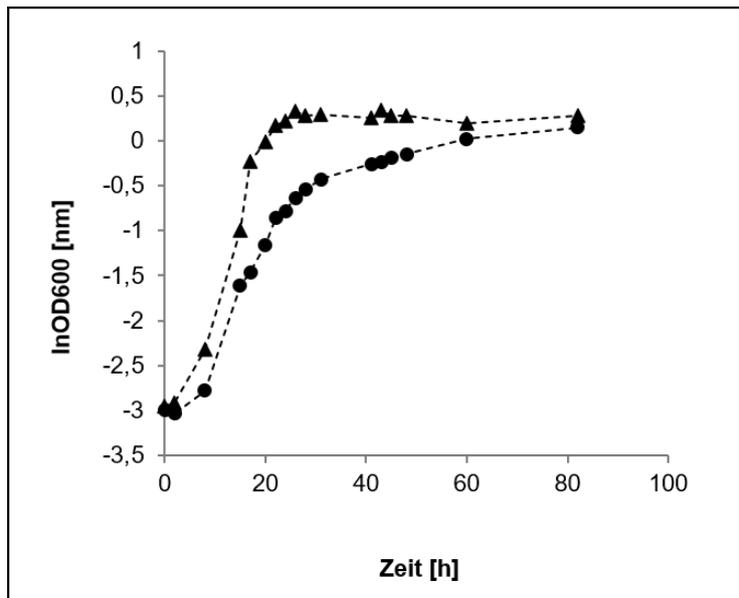
Ein Nachweis der FDH-Aktivität in dem Integrationsstamm *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  erfolgte durch einen photometrischen Test an ganzen Zellen. Diese Messungen dienten einer ersten Einschätzung der Effizienz des gewählten Integrationsortes. Um einen Vergleich zu den bisher ermittelten Aktivitäten der FDH in den verschiedenen Stämmen zu ermöglichen, erfolgte die Analyse nach der gleichen Methode unter einheitlichen Bedingungen (vgl. Kapitel 3.4.2). Für *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  konnte eine FDH-Aktivität von  $404 \pm 10$  mU/mg Gesamtprotein ermittelt werden (Abb. 41). Dies entsprach 56 % der Aktivität des bisherigen Produktionsstammes *G. oxydans* *fdh* mit Plasmid-kodierter FDH. Zudem war die Gesamtaktivität der FDH in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  5 - 8 mal höher als in den Wildtyp-Stämmen *G. japonicus* LMG 1281, *G. albidus* LMG 1768 und *G. japonicus* LMG 26773, die *fdhSCL* bereits natürlicherweise chromosomal trugen (Abb. 41). Diese deutlich höhere Enzymaktivität konnte durch die Verwendung des starken Promotors *p264* erklärt werden, unter dem das *fdhSCL*-Gencluster in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  transkribiert wurde.



**Abbildung 41:** FDH-Aktivität in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* im Vergleich zu anderen Stämmen mit *fdhSCL*-Genen. Die Aktivität wurde an ganzen Zellen mit Fruktose als Substrat sowie 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS als Elektronenakzeptoren bestimmt. Die Reduktion von DCPIP konnte durch die Abnahme der Absorption bei 600 nm gemessen werden. Eine Unit (U) der Proteinaktivität entsprach der Oxidation von 1.0  $\mu$ mol Fruktose pro min pro mg Gesamtzellprotein. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die berechneten Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen sind hier dargestellt.

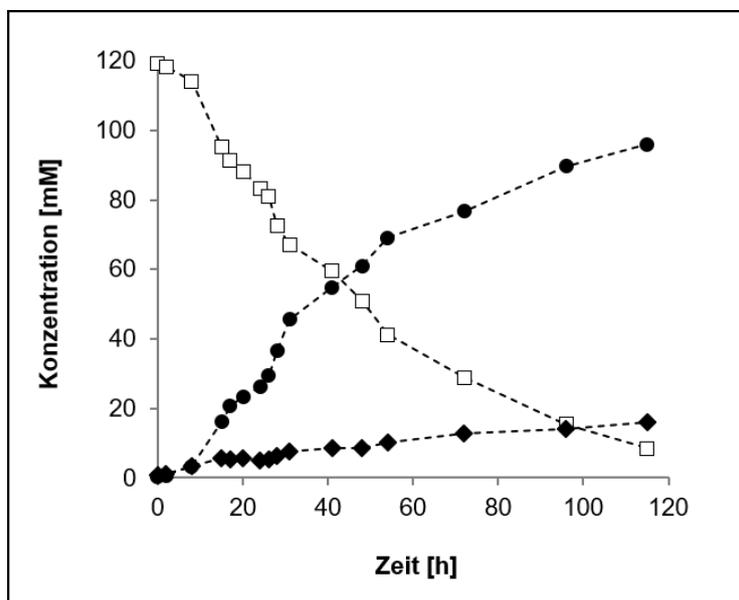
### 3.4.5.3 Antibiotikafreie 5-KF-Produktion durch *G. oxydans* $\Delta$ *mgdh::fdh*

Aufgrund der hohen FDH-Aktivität wurde der Stamm *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* als potentieller 5-KF-Produktionsorganismus getestet. Die Kultivierung erfolgte in YF-Medium mit 120 mM Fruktose und 100 mM MES, pH 6,8, um die generelle Effizienz des Systems im Hinblick auf die Menge an gebildeter 5-KF zu ermitteln. Zum Wachstumsvergleich wurde als Kontrolle *G. oxydans* *fdh* mitgeführt. Anhand der optischen Dichte konnte für *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* in der exponentiellen Wachstumsphase eine Wachstumsrate von 0,11 h<sup>-1</sup> mit einer entsprechenden Verdopplungszeit von 6,1 h bestimmt werden (Abb. 42). Das Wachstum war im Vergleich zu *G. oxydans* *fdh*, für den eine Wachstumsrate von 0,15 h<sup>-1</sup> und einer Verdopplungszeit von 4,4 h in der exponentiellen Phase berechnet wurde, etwas langsamer.



**Abbildung 42:** Wachstum von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  in YF-Medium mit 120 mM Fruktose. Dargestellt ist der Wachstumsverlauf von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  (●) im Vergleich zu *G. oxydans* *fdh* (▲).

In den Kulturüberständen von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  wurden mittels HPLC-Analyse nach einer Kultivierungsdauer von 115 h 96,2 mM 5-KF nachgewiesen, die aus 120 mM Fruktose gebildet wurden (Abb. 43). Neben 5-KF konnten im Verlauf des Experimentes auch 16 mM Acetat detektiert werden. Die Effizienz von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  lag in diesem ersten Versuch bereits bei 80,2 %.



**Abbildung 43:** 5-KF-Produktion durch *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  ausgehend von dem Substrat Fruktose. Die Konzentrationen der Substanzen 5-KF (●), Fruktose (□) und Acetat (◆) wurden mittels HPLC bestimmt.

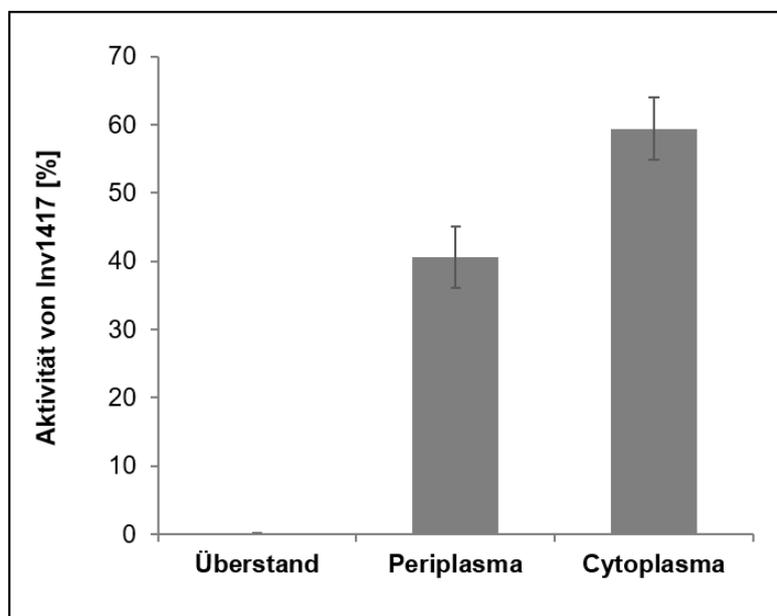
### 3.4.6 Generierung eines Ein-Stamm-Systems durch Integration der Invertase1417

Aufgrund der hohen Produktionseffizienz von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  in der 5-KF-Synthese, eignete sich der Stamm als Basis für die Generierung eines neuen Ein-Stamm-Systems. Da die Funktionalität der rekombinanten Invertase1417 in *G. oxydans* bereits bestätigt werden konnte

(vgl. Kapitel 3.2.5), sollte *inv1417* durch Transformation des Plasmids pBBR1p264-*inv1417* in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* exprimiert und somit ein Ein-Stamm-System erstellt werden. Nach Verifizierung des so generierten Stammes *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* durch ein Kolonie-PCR, erfolgte eine Analyse der Translokation der rekombinanten Invertase und eine erste 5-KF-Produktion aus Saccharose.

### 3.4.6.1 Zellfraktionierung zur Überprüfung der Translokation der heterolog produzierten Invertase1417

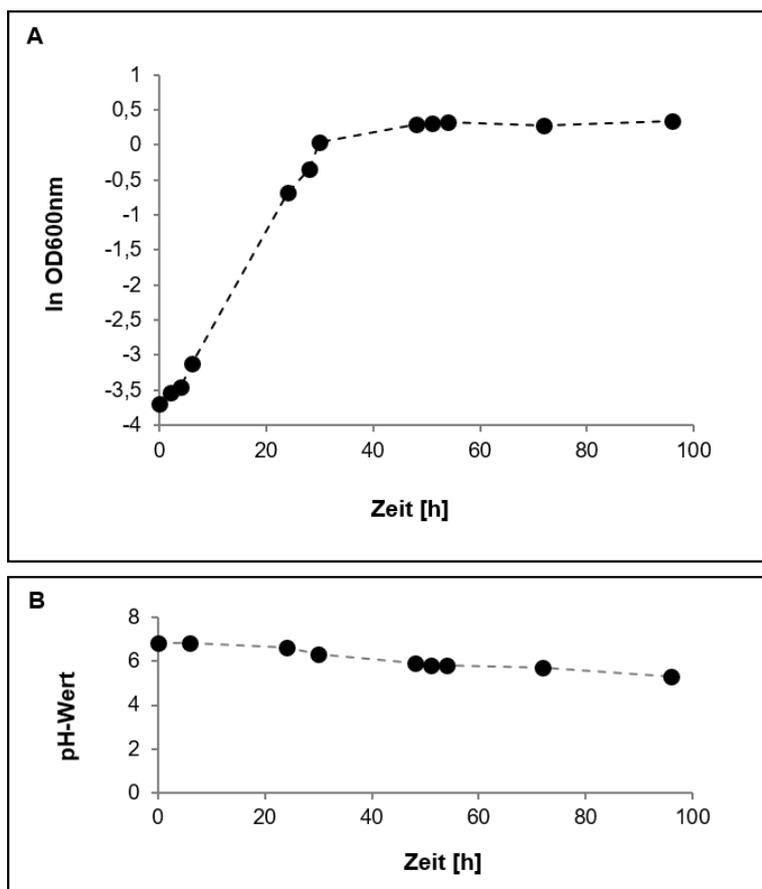
Um das Disaccharid Saccharose, das über Porine der äußeren Membran ins Periplasma von *G. oxydans* diffundiert, effizient spalten zu können, war eine periplasmatische Lokalisation der Invertase für den Produktionsprozess notwendig. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte eine Tat-abhängige Signalsequenz (vgl. Kapitel 3.2.1) für Inv1417 identifiziert werden, wodurch eine Lokalisation im Periplasma theoretisch möglich war. Um die Funktionalität des Transports zu verifizieren, wurde die Aktivität des Enzyms im Expressionsstamm nach einer Zellfraktionierung sowohl in den periplasmatischen und cytoplasmatischen Fraktionen, als auch im Zellüberstand gemessen. 40,6 % der Aktivität von Inv1417 konnte im Periplasma von *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* detektiert werden, während die verbleibenden 59,4 % in der cytoplasmatischen Fraktion gefunden wurden (Abb. 44). Zur Kontrolle der Zellfraktionierung erfolgte der Nachweis über die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die intrazellulär exprimiert wird. Hierbei konnten 93,7 % der Aktivität in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden. Die periplasmatische Präparation enthielt somit keine signifikanten Mengen von cytoplasmatischen Bestandteilen.



**Abbildung 44:** Lokalisation des Enzyms Inv1417 im Expressionsstamm. Die Zuordnung der Proteinanteile im Überstand, im Periplasma und im Cytoplasma erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität in den jeweiligen Fraktionen, welche mittels HPLC durch die Abnahme von Saccharose nachgewiesen wurde.

### 3.4.6.2 Synthese von 5-KF aus Saccharose mit *G. oxydans* $\Delta mgdh::fdh\ inv$

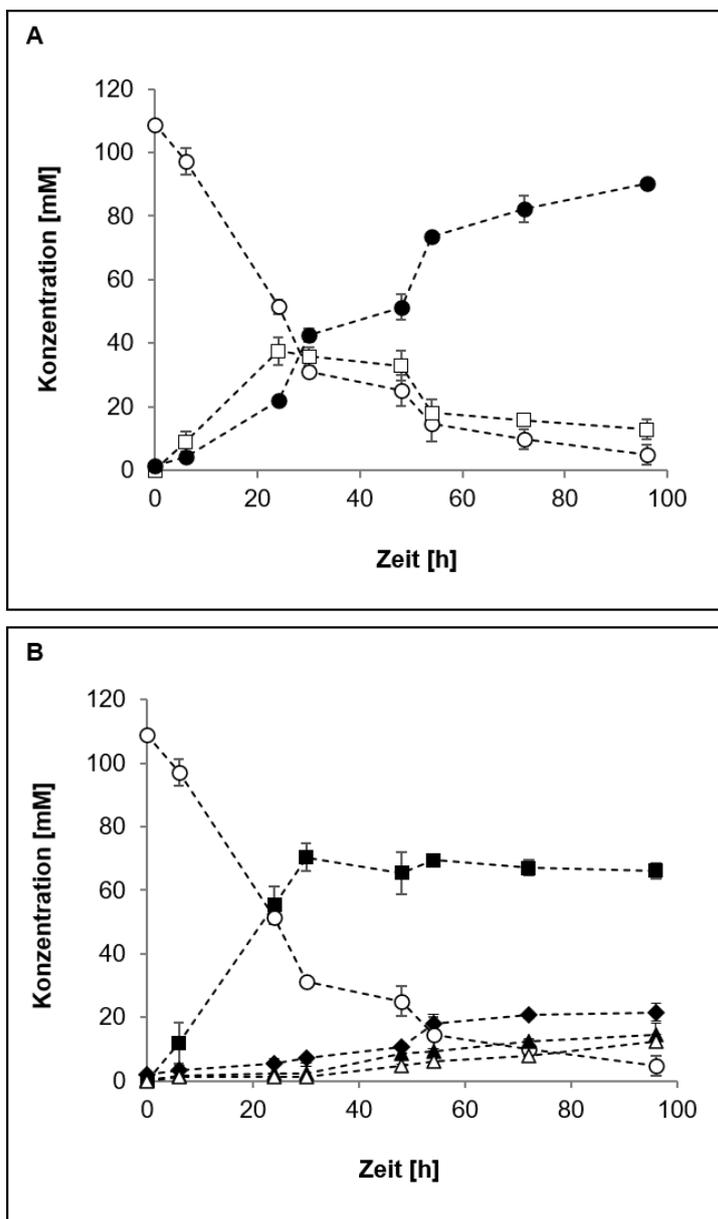
Im nächsten Schritt wurde die Effizienz des Expressionsstammes *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  hinsichtlich der Produktbildung ausgehend von Saccharose durch eine Kultivierung in YS-Medium mit 110 mM Substrat bei pH 6,5 und 30 °C für 96 h analysiert. Unter Betrachtung der optischen Dichten konnte in den ersten 32 h eine Wachstumsrate von  $0,091\ h^{-1}$  mit einer Verdopplungszeit von 7,7 h ermittelt werden (Abb. 45 A). Die optische Dichte betrug zu diesem Zeitpunkt 1,2 und erreichte am Ende des Experimentes nach 96 h einen Wert von 1,5. Der pH-Wert sank im Verlauf der Kultivierung von 6,8 auf 5,3 (Abb. 45 B).



**Abbildung 45:** Wachstum von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  in YS-Medium mit 110 mM Saccharose. A. Wachstumsverlauf von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$ . B. pH-Verlauf während der Kultivierung auf Saccharose. Der Ansatz wurde mit 100 mM MES gepuffert.

Durch eine HPLC-Analyse der Kulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten konnte nachgewiesen werden, dass *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  heterolog eine aktive Invertase produzierte und damit die Hydrolyse von Saccharose ermöglichte (Abb. 46). Die Umsatzraten lagen in den ersten 32 h des Experimentes bei  $2,5\ mmol\ L^{-1}\ h^{-1}$ . Nach 96 h war die Saccharosespaltung nahezu vollständig abgeschlossen. Über den gesamten Zeitraum konnten 90,2 mM 5-KF aus den resultierenden Fruktoseeinheiten durch Oxidation der FDH umgewandelt werden (Abb. 46 A). Eine Restkonzentration von 12,9 mM Fruktose verblieb im Medienüberstand. Eine Produktion von Levan konnte nicht detektiert werden. Neben 5-KF wurden außerdem 66 mM Glukose nachgewiesen, die als zweites Monosaccharid der Hydrolyse von Saccharose im Medium akkumulierte. Als Produkte

des Glukosemetabolismus konnten 14,4 mM 2-Ketoglukonat, 12,6 mM 5-Ketoglukonat und 21,5 mM Acetat identifiziert werden (Abb. 46 B). Diese Ergebnisse belegten eindeutig, dass die heterolog produzierten Enzyme FDH und Inv1417, im untersuchten Ein-Stamm-System aktiv vorlagen und zu einer Produktion von 5-KF aus dem Substrat Saccharose führten. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt, um eine verlässliche Ausbeute des Systems bestimmen zu können. Dadurch ergab sich aus allen Analysen eine gemittelte Ausbeute von  $84 \pm 2 \%$  5-KF.



**Abbildung 46:** 5-KF-Produktion aus Saccharose durch das Ein-Stamm-System *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$ . A. Fruktosemetabolismus: Saccharose (○), 5-KF (●), Fruktose (□). B. Glukosemetabolismus: Glukose (■), 2-Ketoglukonat (▲), 5-Ketoglukonat (Δ), Acetat (◆). Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sind in der Abbildung angegeben.

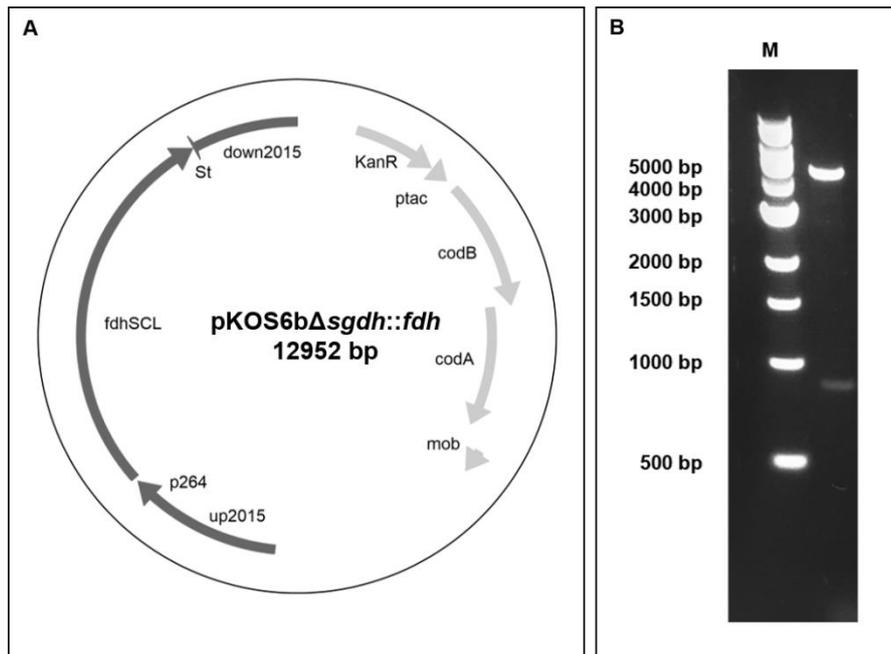
Mit dem Ein-Stamm-System *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  konnte die Effizienz der 5-KF-Produktion aus Saccharose gegenüber den Stämmen *G. japonicus* LMG 26773 *fdh* und *G. japonicus* LMG 1281 *inv* deutlich erhöht werden. Aufgrund der notwendigen Kultivierungsdauer von mindestens

96 h, war im Hinblick auf einen industriellen Einsatz des Stammes eine Steigerung der FDH-Aktivität und eine Reduktion der Produktionszeit wünschenswert.

### 3.5 Optimierung der Produktionszeit durch Erstellen einer Doppelintegrationsmutante

Zur Verringerung der Kultivierungsdauer von 96 h, die für eine effiziente 5-KF-Synthese mit *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  *inv* benötigt wurde, erfolgte eine zweite Integration des *fdhSCL*-Genclusters in das Genom des Stammes. Dies sollte die Aktivität der FDH verbessern und die Produktionszeit entsprechend reduzieren, aber auch zu einer Steigerung der finalen 5-KF-Ausbeute führen (vgl. Kapitel 4.8.1). Während der 5-KF-Synthese mit *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  *inv* wurden außerdem 14,4 mM 2-Ketoglukonat und 12,6 mM 5-Ketoglukonat als Produkte des Glukosemetabolismus gebildet (Abb. 46), was durch die lösliche Glukose-Dehydrogenase, kodiert durch *gox2015*, zu erklären war (vgl. Kapitel 4.7.2 und 4.7.3). Um die Verwertung von Glukose für die geplante Integration einer Glukose-Isomerase in den 5-KF-Produktionsprozess (vgl. Kapitel 4.8.3) in der zweiten Förderphase des Projektes weiter zu reduzieren, erwies sich die Deletion von *gox2015* und die Integration von *fdhSCL* an dieser Stelle als sinnvoll.

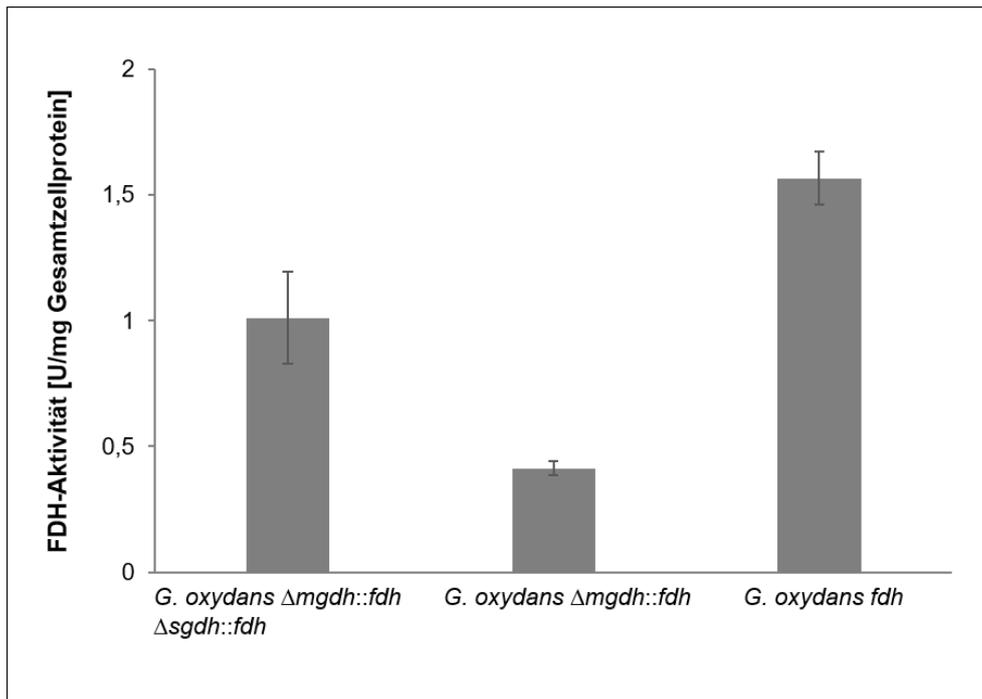
Die Konstruktion des Deletions- bzw. Integrationsplasmids orientierte sich an dem zuvor beschriebenen Prinzip (vgl. Kapitel 2.3.9 und 3.4.5.1). Als Basis wurde erneut der Vektor pKOS6b verwendet. Die benötigten DNA-Fragmente pKOS6b, up-*gox2015*, p264-*fdhSCL* und down-*gox2015* wurden unter Einsatz der Primer pKOS6b.F/R, up-*gox2015*.F/R, down-*gox2015*.F/R und p264-*fdh*.*sgdh*.F/R mit spezifischen Überhängen amplifiziert. Die Assemblierung dieser Amplifikate erfolgte nach Herstellvorschrift unter Verwendung des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes (vgl. Kapitel 3.4.5.1, Abb. 38). Das resultierende Plasmid pKOS6b $\Delta$ *sgdh::fdh* (Abb. 47 A) wurde anschließend erst in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen und dann in *G. oxydans* eingebracht. Eine durchgeführte erste homologe Rekombination wurde durch das Vorhandensein des im Vektorrückgrat befindlichen Gens *codA* nachgewiesen. Klone, die auf Selektivagar wuchsen und nachweislich das Deletionsplasmid ins Genom integriert hatten, wurden für die zweite homologe Rekombination eingesetzt. Die Gegenselektion fand auf FC-haltigen Agarplatten statt. Der Nachweis der Deletion des Gens *gox2015* und die gleichzeitige Integration des *fdhSCL*-Genclusters in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  erfolgte durch eine Kolonie-PCR. Für die Kontrolle dieser zweiten *fdh*-Genomintegration konnten die Primer p264-*fdhSCL*.*strep*-F/R nicht verwendet werden, da ein positives Fragment bereits durch die erste Integration generiert werden konnte. Daher wurden die Primer up-*gox2015*.F/p264-*fdh*.*sgdh*.R eingesetzt, die 1000 Basenpaare oberhalb des deletierten Gens *gox2015* und hinter dem integrierten *fdhSCL*-Gencluster binden konnten. Dadurch ergab sich nur dann ein 5190 bp großes Amplifikat, wenn *fdhSCL* genau an der Stelle des Gens *gox2015* integriert wurde. Ein passendes Fragment konnte mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 47 B).



**Abbildung 47:** Generierung der Mutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ . A: Integrationsplasmid für die Deletion von *gox2015* im Austausch gegen das *fdhSCL*-Gencluster. KanR: Kanamycinresistenz, rep: Replikationsursprung; ptac: tac-Promotor; mob: Mobilisierungsgen; *codA*: Cytosin-Deaminase; *codB*: Cytosin-Permease. B: Nachweis der zweiten *fdh*-Integration in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  zur Erzeugung von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ . Unter Verwendung der Primer Up-*gox2015*.F und p264-*fdh*.*mgdh*.R konnte nur dann ein Fragment erzeugt werden, wenn *fdhSCL* im Genom des Stammes anstelle des Gens *gox2015* integriert wurde. Das berechnete Fragment wies eine passende Größe von 5190 bp auf. M: 1 kb Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

### 3.5.1 Vergleich der FDH-Aktivität von *G. oxydans* $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ mit bisherigen Stämmen

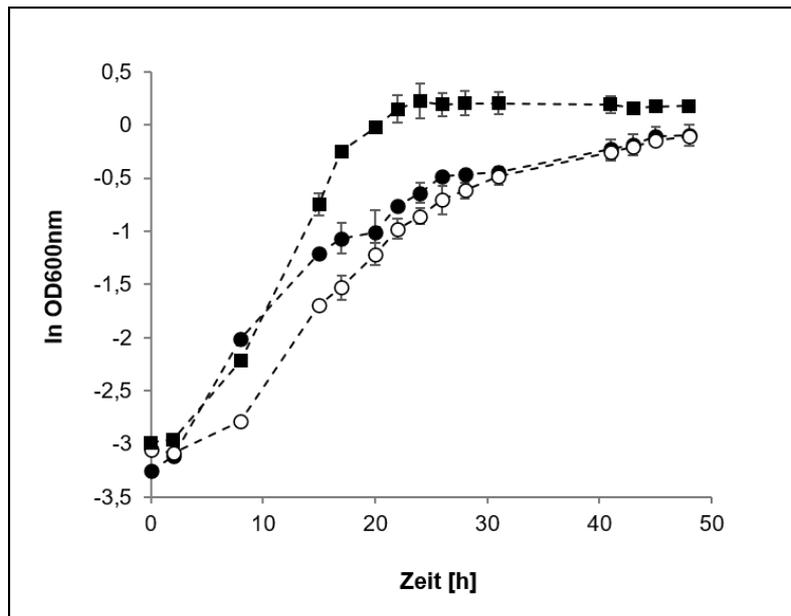
Die Bestimmung der Aktivität der FDH in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  durch eine photometrische Analyse stellte die schnellste Möglichkeit dar, die Funktionalität des Stammes zu überprüfen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden auch die Einzelintegrationsmutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  und das Plasmid-basierte System *G. oxydans* *fdh* mitgeführt. Die Ergebnisse belegten, dass die zweite Integration des *fdhSCL*-Genclusters zu einer deutlichen Verbesserung der FDH-Aktivität, ermittelt an ganzen Zellen führte (Abb. 48). Mit einem Wert von  $1,01 \pm 0,22$  U/mg Gesamtprotein war die Enzymaktivität, im Vergleich zu *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$ , mehr als doppelt so hoch. Der Stamm *G. oxydans* *fdh* wies mit  $1,5 \pm 0,12$  U/mg Gesamtprotein die höchste Aktivität auf, was aufgrund der Plasmid-vermittelten FDH-Produktion zu erwarten war.



**Abbildung 48:** Ermittlung der FDH-Aktivität von *G. oxydans* $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ . Die Messung der Aktivität erfolgte an ganzen Zellen. Als Substrat wurde Fruktose eingesetzt. 0,15 mM DCPIP und 0,65 mM PMS dienten als Elektronenakzeptoren. Die Reduktion von DCPIP war durch die Abnahme der Absorption bei 600 nm bestimmbar. Eine Unit (U) der Proteinaktivität entspricht der Oxidation von 1  $\mu$ mol Fruktose pro min pro mg Gesamtprotein. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen und die daraus berechneten Standardabweichungen.

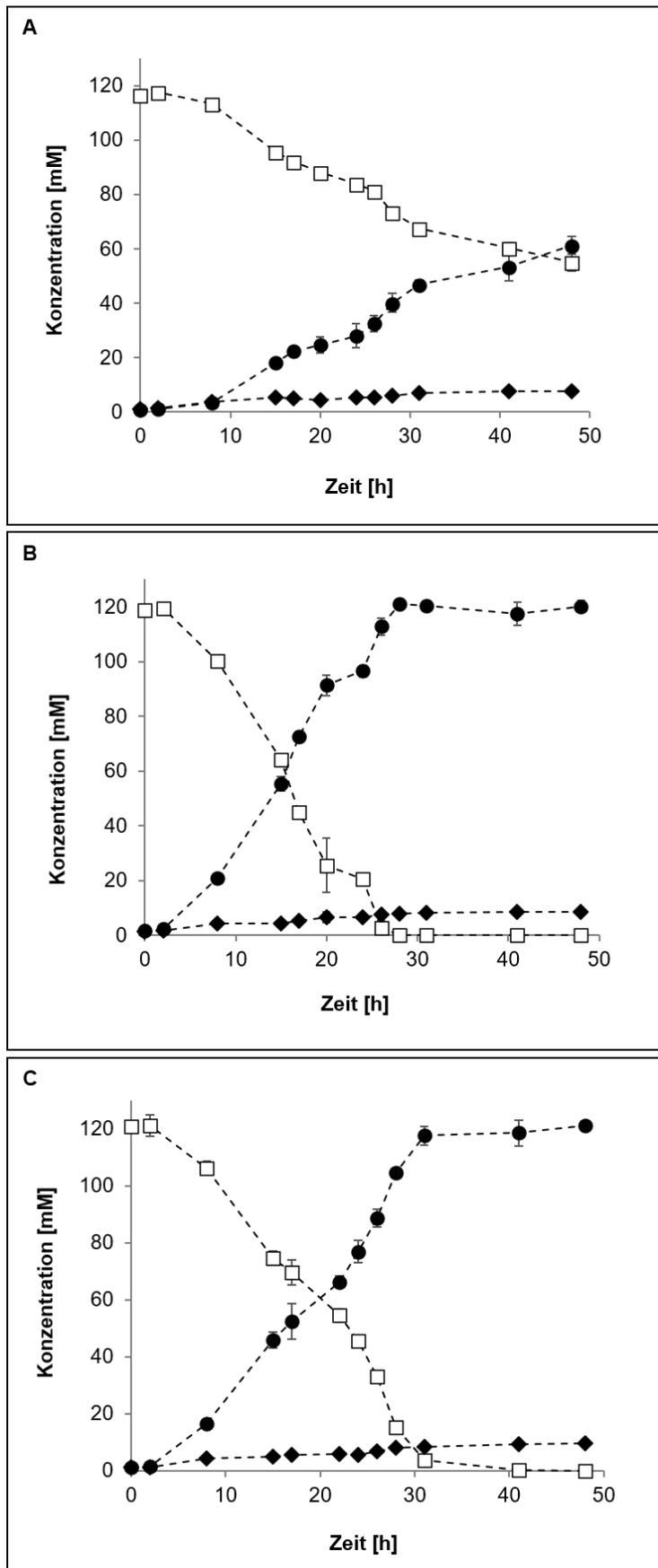
### 3.5.2 Effizienz von *G. oxydans* $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ bei Kultivierung auf Fruktose

Um die Auswirkung der zweiten Genomintegration auf die Effizienz der 5-KF-Produktion zu bestimmen, wurde die Doppelintegrationsmutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  in YF-Medium mit 120 mM Fruktose kultiviert. Für einen direkten Vergleich wurden die Stämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  und *G. oxydans* *fdh* ebenfalls unter den gleichen Bedingungen mitgeführt. Dabei sollte neben der Menge an gebildeter 5-KF auch eine mögliche Optimierung der Produktionszeit geprüft werden. Für die Analyse war daher nur ein Kultivierungszeitraum von maximal 50 Stunden relevant. Im ersten Schritt wurde der Wachstumsverlauf untersucht. Hierbei konnten bereits erste Unterschiede zwischen den drei Stämmen detektiert werden. *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  mit nur einer *fdh*-Integration zeigte im Vergleich die geringste Wachstumsrate ( $0,08 \text{ h}^{-1}$ ) und eine relativ hohe Verdopplungszeit von 7,7 h in der exponentiellen Phase (Abb. 49). Die Doppelintegrationsmutante wies hingegen eine erhöhte Wachstumsrate von  $0,11 \text{ h}^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 6,1 h auf. Nach einer Kultivierungsdauer von 48 h erreichten beide Stämme jedoch vergleichbar hohe optische Dichten von 0,9 - 0,93 (Abb. 49). Für den plasmidtragenden Stamm *G. oxydans* *fdh* konnte eine finale optische Dichte von 1,1 bestimmt werden. Die Verdopplungszeit in der exponentiellen Phase betrug 4,8 h.



**Abbildung 49:** Wachstumsvergleich verschiedener FDH-Expressionsstämme bei Kultivierung in YF-Medium mit 120 mM Fruktose. Der Wachstumsverlauf der Stämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  ( $\bullet$ ), *G. oxydans* *fdh* ( $\blacksquare$ ) und *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  ( $\circ$ ) ist als natürlicher Logarithmus der optischen Dichte bei 600 nm dargestellt.

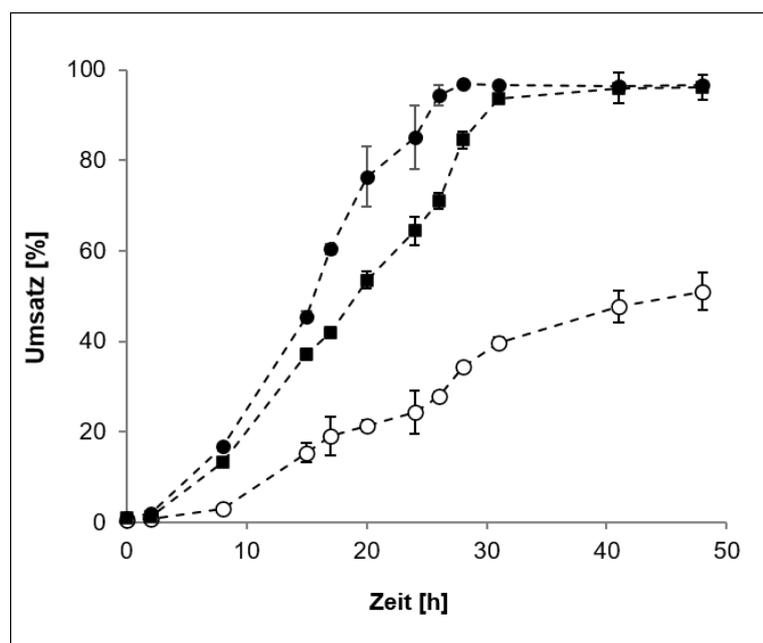
Die Bestimmung der 5-KF-Ausbeute erfolgte durch eine HPLC-Analyse der Kulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten. Es zeigte sich, dass *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen die geringste Bildung des gewünschten Produktes aufwies (Abb. 50 A). Nach einer Kultivierungsdauer von 48 h konnte nur die Hälfte der verfügbaren Fruktoseeinheiten zu 5-KF oxidiert werden. Zudem wurden 9,6 mM Acetat detektiert. Die Rate für die Substratoxidation lag in diesem Stamm in den ersten 28 h bei  $1,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Wesentlich höhere Mengen an 5-KF konnten in den Kulturüberständen von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  nachgewiesen werden (Abb. 50 B). Bereits nach 28 h wurde eine vollständige Umsetzung von Fruktose beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt lagen 120 mM 5-KF und 8,3 mM Acetat im Kulturüberstand vor. Für die Umsatzrate von Fruktose zu 5-KF konnte ein Wert von  $4,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bestimmt werden. Neben der verbesserten Produktausbeute konnte durch die zweite Integration von *fdhSCL* in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  auch die Kultivierungsdauer deutlich verkürzt werden (Abb. 50 B). Im direkten Vergleich wurden in den Kulturüberständen des Plasmid-basierten Systems *G. oxydans* *fdh* nach einer Inkubationszeit von 28 h 106,2 mM 5-KF, 7,8 mM Acetat und eine verbleibende Fruktosekonzentration von 15,36 mM nachgewiesen (Abb. 50 C). Die Umsatzrate für die Oxidation von Fruktose zu 5-KF lag in diesem Stamm bei  $3,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Abbildung 50:** Fruktoseoxidation in FDH-Integrationsstämmen. Alle Stämme wurden in YF-Medium mit 120 mM Fruktose, pH 6,5, bei 30 °C für 48 h kultiviert. Der Fruktosemetabolismus der Stämme *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* (A), *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* $\Delta$ *sgdh::fdh* (B) und *G. oxydans* *fdh* (C) wurde mit

Hilfe einer HPLC-Analyse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Die daraus berechneten Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen sind angegeben. Für alle Stämme ist die Abnahme der Fruktosekonzentration ( $\square$ ) sowie die Bildung von 5-KF ( $\bullet$ ) und Acetat ( $\blacklozenge$ ) dargestellt.

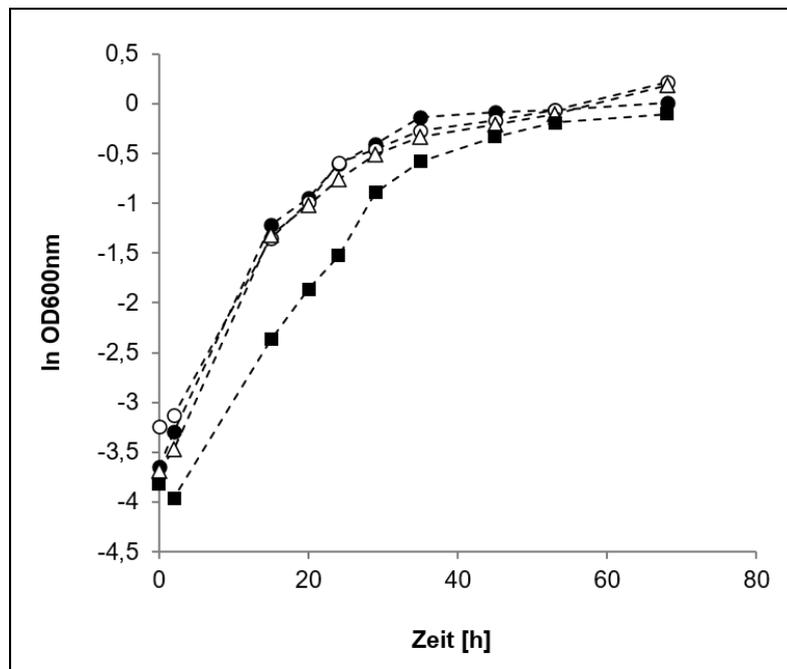
Um die Effizienz hinsichtlich der Produktbildung besser vergleichen zu können, wurde nur die Zunahme von 5-KF als prozentualer Umsatz betrachtet (Abb. 51). Nach einer Kultivierungsdauer von nur 28 h konnten bereits 96,5 % aller verfügbaren Fruktoseeinheiten durch *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  zu 5-KF oxidiert werden. Der plasmidtragende Stamm *G. oxydans* *fdh* erreichte im selben Zeitraum einen Prozentanteil von 85,3 %. Durch den Einzelintegrationsstamm *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  wurden lediglich 36,2 % der Fruktoseeinheiten zu 5-KF umgewandelt (Abb. 51). Durch die zweite Integration des *fdhSCL*-Genclusters in das Genom des Stammes *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  konnte die 5-KF-Produktion somit deutlich verbessert werden. Neben der gebildeten Produktmenge wurde auch die Kultivierungsdauer optimiert. Die Effizienzen von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  überstiegen in dieser Analyse sogar die des bisherigen Produktionsstamm *G. oxydans* *fdh* (Siemen et al. 2018). Zudem war der Einsatz eines Antibiotikums nicht mehr notwendig, was im Hinblick auf einen industriell genutzten Prozess einen großen Vorteil des Doppelintegrationsstammes darstellte.



**Abbildung 51:** Prozentualer Umsatz von Fruktose zu 5-KF durch verschiedene FDH-Produktionsstämme. Die Konzentrationen wurde mittels HPLC aus den Kulturüberständen der drei Stämme bestimmt. Dargestellt ist der daraus berechnete Umsatz in Prozent für die Stämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  ( $\bullet$ ), *G. oxydans* *fdh* ( $\blacksquare$ ) und *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  ( $\circ$ ). Die Ergebnisse wurden aus drei Versuchen ermittelt und sind als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben.

Um die Gegebenheiten von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  als 5-KF-Produktionsorganismus weiter zu charakterisieren und das System an einen industriellen Einsatz anzupassen, sollte die maximale Produktmenge unter Einsatz hoher Fruktosekonzentrationen bestimmt werden. Vor dem eigentlichen Versuch wurde dafür die höchste einsetzbare Fruktosekonzentration ermittelt, bei der

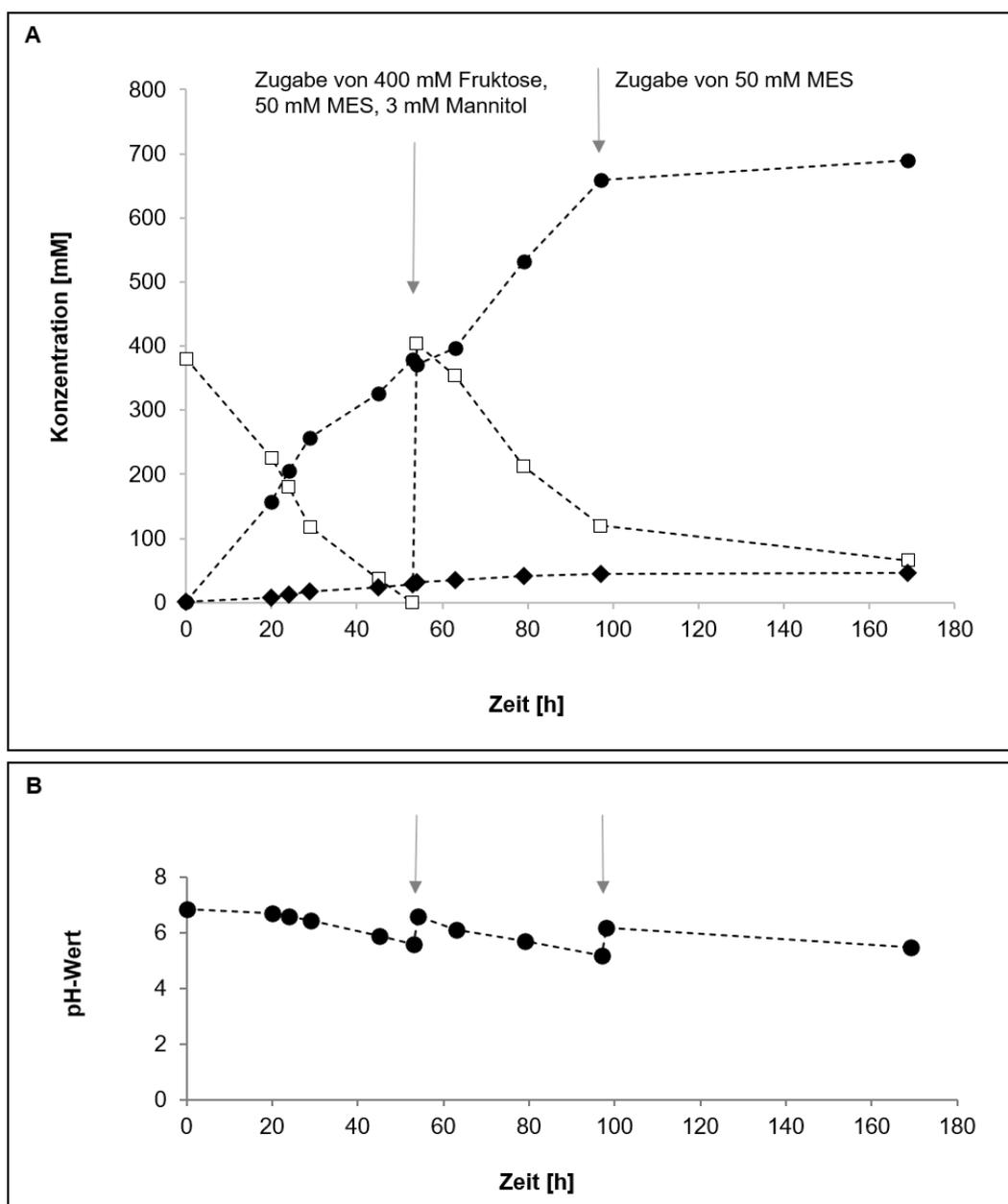
keine Auswirkungen auf das Wachstum von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  beobachtet werden konnten. Zum Schutz gegen osmotischen Stress wurden dem Medium zusätzlich 3 mM Mannitol zugefügt (Zahid et al. 2015). Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung in einem 500 ml Schikankolben mit einem Arbeitsvolumen von maximal 100 ml. Unter Betrachtung der optischen Dichte konnten bei Konzentrationen zwischen 100 und 400 mM Fruktose keine Unterschiede im Wachstum von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  detektiert werden (Abb. 52). Die Kulturen wiesen vergleichbare Wachstumsraten von  $0,108 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  auf, die entsprechenden Verdopplungszeiten in der exponentiellen Phase lagen bei 6,3 - 6,4 h. Ab einer Fruktosekonzentration von 500 mM im Medium verlangsamte sich das Wachstum des Stammes (Abb. 52). Die Wachstumsrate lag bei einem Wert von  $0,08 \text{ h}^{-1}$  mit einer Verdopplungszeit von 7,7 h in der exponentiellen Phase. Für den nachfolgenden Versuch zur Produktion von 5-KF aus hohen Fruktosemengen wurde daher eine Startkonzentration von 400 mM Fruktose gewählt. Das Medium beinhaltete zusätzliche 3 mM Mannitol und 6 g/L Hefeextrakt und wurde mit 100 mM MES, pH 6,8 gepuffert.



**Abbildung 52:** Auswirkung hoher Fruktosekonzentrationen auf das Wachstum von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$ . Die Kultivierung erfolgte in YF-Medium mit 100 mM Fruktose (●), 250 mM Fruktose (○), 400 mM (Δ) oder 500 mM Fruktose (■).

Durch eine Analyse der Kulturüberstände mittels HPLC wurde nachgewiesen, dass 400 mM Fruktose in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  nach einer Kultivierungsdauer von 53 h vollständig umgesetzt werden konnten (Abb. 53 A). Zu diesem Zeitpunkt lag eine 5-KF-Konzentration von 379 mM vor, zusätzlich wurden 12,1 mM Acetat detektiert. Der pH-Wert der Kultur lag bei 5,6 (Abb. 53 B). Als Rate für die Substratoxidation konnte ein Wert von  $7,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  errechnet werden. Um die Ausbeute von 5-KF weiter zu erhöhen, wurden der Kultur nach diesem Zeitpunkt weitere 400 mM Fruktose sowie 3 mM Mannitol als Schutz vor osmotischem Stress zugegeben. Zudem wurde

der pH-Wert durch den Einsatz von 50 mM MES (pH 6,8) korrigiert, um ein zu starkes Ansäuern des Mediums im weiteren Verlauf des Experimentes zu verhindern. Weitere 340 mM Fruktose konnten in einem Zeitraum von 115 h umgesetzt werden. Daraus resultierten weitere 318 mM 5-KF sowie 19,6 mM Acetat (Abb. 53 A). Eine Restfruktosemenge von 61 mM war zum Ende des Experiments noch im Kulturüberstand nachweisbar. Zudem fiel auf, dass die Oxidation von Fruktose zu 5-KF nach einer Kultivierungsdauer von 100 h und der zu diesem Zeitpunkt erfolgten letzten Zugabe des MES-Puffers, nur noch verringert ablief. Vermutlich kam es durch die kurzzeitige Unterbrechung des Schüttelvorgangs zu einer Sauerstofflimitierung in der Kultur. Insgesamt konnten in diesem Experiment 690 mM 5-KF in einem Zeitraum von 169 h im Schüttelkolben ohne Zusatz eines Antibiotikums produziert werden.

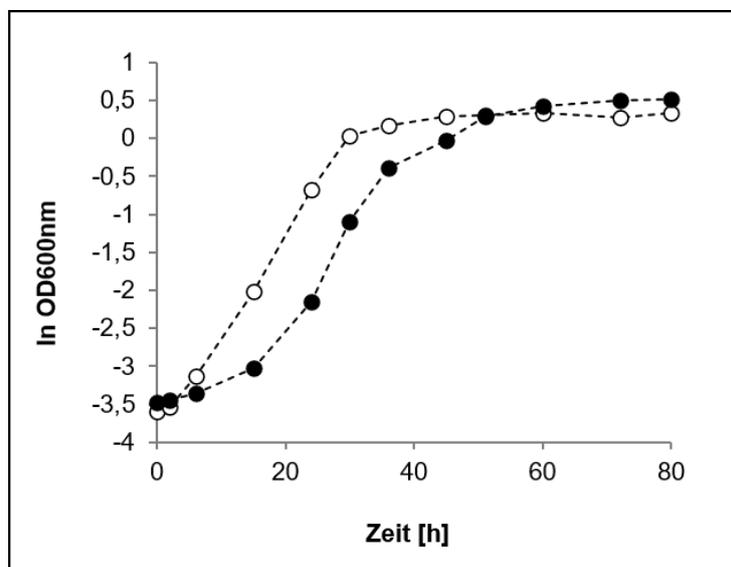


**Abbildung 53:** Antibiotikafreie 5-KF-Produktion mit *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  unter hohen Fruktosekonzentrationen. A: Fruktosemetabolismus mit einer Startkonzentration von 400 mM. Dargestellt sind neben dem Substrat Fruktose (□) die Produkte 5-KF (●) und Acetat (◆). Nach einer

Kultivierungsdauer von 53 h wurden der Kultur weitere 400 mM Fruktose sowie 3 mM Mannitol und 50 mM MES zugefügt (mit Pfeilen markiert). B: pH-Verlauf während der Kultivierung. An den markierten Stellen wurde die Kultur jeweils mit 50 mM MES, pH 6,8 nachgepuffert.

### 3.5.3 Saccharosemetabolismus in *G. oxydans* $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$

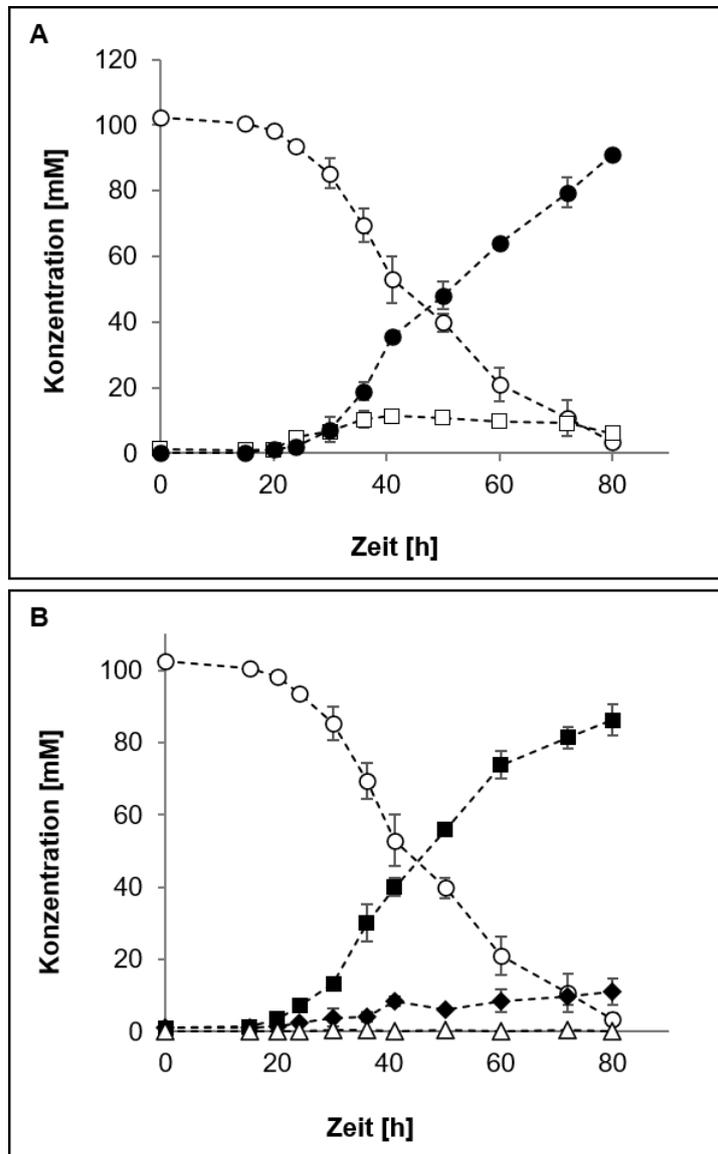
Aufgrund der deutlich gesteigerten Produktionseffizienz gegenüber der Einzelintegrationsmutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$ , stellte der Doppelintegrationsstamm *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  die Basis für die Generierung eines optimierten Ein-Stamm-Systems aus Saccharose dar. Um dies zu überprüfen, wurde das Plasmid pBBR1p264-*inv1417* in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  transformiert. Nach Verifizierung des Stammes *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  mittels Kolonie-PCR erfolgte eine Analyse des Saccharosemetabolismus durch Kultivierung in YS-Medium mit 100 mM Saccharose bei pH 6,5 und 30 °C für 80 h. Die Einzelintegrationsmutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  wurde als Kontrolle unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Bereits bei Bestimmung der optischen Dichte zeigte sich, dass *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  ein verzögertes Wachstum auf Saccharose aufwies (Abb. 54). Erst nach einer Kultivierungsdauer von 12 h konnte ein exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von 0,09 h<sup>-1</sup> und einer Verdopplungszeit von 7,5 h detektiert werden. Bis zu diesem Zeitpunkt lag die optische Dichte nur bei einem Wert von 0,042. *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  wies hingegen eine kürzere lag-Phase auf, was im Vergleich zu einer erhöhten Wachstumsrate von 0,12 h<sup>-1</sup> und einer reduzierten Verdopplungszeit von 5,5 h führte.



**Abbildung 54:** Wachstum von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  und *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  auf Saccharose. Dargestellt ist der Wachstumsverlauf von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  (●) zur Kontrolle *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  (○) als natürlicher Logarithmus der optischen Dichte bei 600 nm.

Die HPLC-Auswertung der Kulturüberstände ergab, dass zu Beginn des Experimentes nur geringe Mengen an Saccharose hydrolysiert werden konnten (Abb. 55), was das verzögerte Wachstum des Stammes erklärte. In den ersten 24 h wurden lediglich 9 mM Saccharose gespalten, weshalb eine effiziente Hydrolyse des Substrats erst nach diesem Zeitraum detektiert werden konnte (Abb. 55 A). Die Umsatzrate in den ersten 24 h lag daher lediglich bei 0,4 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und erhöhte sich

anschließend auf einen Wert von  $1,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bis zum Ende des Experimentes. In Kultivierungen von *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh inv}$ , der in diesem Fall als Kontrolle diente, konnten zu diesem Zeitpunkt bereits 58 mM Saccharose gespalten werden (vgl. Kapitel 3.4.6.2, Abb. 46).



**Abbildung 55:** 5-KF-Produktion aus Saccharose durch *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$ . A: Fructosemetabolismus. Dargestellt ist die Abnahme von Saccharose (○), die Freisetzung von Fructose (□) und das daraus gebildete Produkt 5-KF (●). B: Glukosemetabolismus, mit Saccharose (○), Glukose (■), Acetat (◆) sowie 2- und 5-Ketoglukonat (Δ). Die Kultivierung erfolgte in YS-Medium mit 100 mM Saccharose, pH 6,5, bei 30 °C für 80 h. Das Experiment wurde zwei Mal durchgeführt. Die daraus errechneten Standardabweichungen sind angegeben.

Durch die verzögerte Saccharosespaltung konnte eine Produktion von 5-KF in Kulturüberständen von *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  entsprechend erst nach einer Kultivierungsdauer von 24 h beobachtet werden. Da in diesem Zeitraum nur geringe Konzentrationen an freier Fructose vorlagen, war die Umsatzrate für die Substratoxidation mit einem Wert von lediglich  $0,08 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  sehr gering. Anschließend konnte mit zunehmender Effizienz der Hydrolyse des Disaccharids auch die Menge an gebildeter 5-KF gesteigert werden (Abb. 55 B). Als Gesamtrate für die

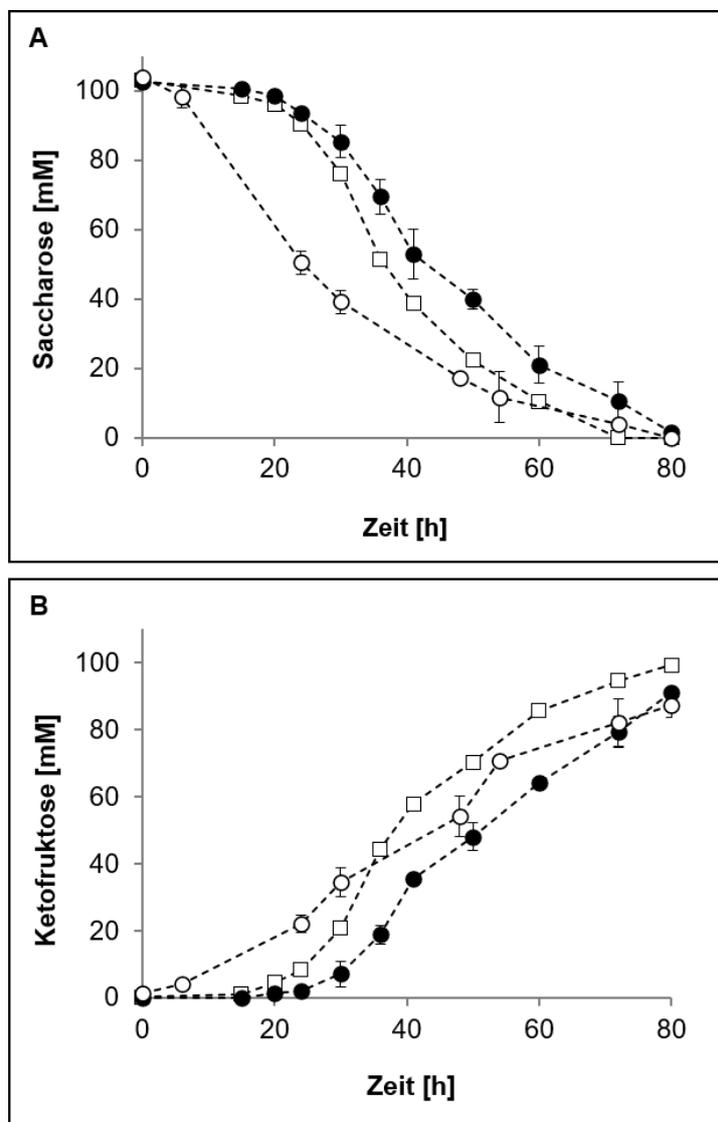
Fruktoseoxidation konnte für den Zeitraum nach 24 h ein Wert von  $1,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  berechnet werden. Neben Fruktose wurde als Produkt der Saccharosespaltung auch Glukose in den Kulturüberständen detektiert. Im Zuge des reduzierten Glukosemetabolismus entstanden daraus  $11 \text{ mM}$  Acetat, zudem verblieb eine Restkonzentration von  $85 \text{ mM}$  Glukose im Medium. Die Bildung von 2- und 5-Ketoglukonat konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 55 B), was aufgrund der Deletion von *gox2015* und *gox0265* in *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  zu erwarten war.

### 3.5.3.1 Saccharosespaltung und 5-KF-Produktion aller *fdh*-Integrationsstämme im Vergleich

Um die erstellten FDH-Integrationsstämme hinsichtlich der 5-KF-Produktion aus Saccharose miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Kultivierung von *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh inv}$  und *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  unter identischen Bedingungen in YS-Medium mit  $100 \text{ mM}$  Saccharose bei pH 6,5. *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  wies in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine verzögerte Saccharosespaltung auf, die im Einzelintegrationsstamm *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh inv}$  nicht detektiert werden konnte. Um dies näher zu untersuchen, wurde in diesem Experiment ein weiterer FDH-Doppelintegrationsstamm, *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* (Battling et al. 2020), vergleichend mitgeführt. Dabei sollte analysiert werden, ob auch in diesem Stamm eine verminderte Saccharosespaltung vorlag, die theoretisch durch eine erhöhte heterologe Produktion von membrangebundenen Fruktose-Dehydrogenasen bei zwei FDH-Integrationen erklärt werden könnte. *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* basierte auf dem Stamm *G. oxydans* IK003.1, der für eine 5-KF-Produktion ebenfalls mit zwei *fdh*-Genomintegrationen modifiziert wurde. Das *fdhSCL*-Gencluster war in diesem Stamm zwischen *gox0028* und *gox0029* sowie *gox0038* und *gox0039* integriert (Battling et al. 2020). Zusätzlich trug der Stamm, wie auch *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$ , das Plasmid pBBR1p264-*inv1417*.

Ein Vergleich der Saccharosespaltung in Kultivierungen der Doppelintegrationsstämme *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  und *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* mit *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh inv}$  verdeutlichte, dass die effizienteste Hydrolyse des Disaccharids in dem bisherigen Ein-Stamm-System *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh inv}$  vorlag (Abb. 56 A). Eine schnelle Abnahme der Saccharosekonzentration konnte in diesem Stamm bereits zu Beginn der Kultivierung detektiert werden. In den ersten 24 h des Experimentes lag die Umsatzrate bei einem Wert von  $2,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , während *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  und *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* lediglich Werte von  $0,4 - 0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  aufwiesen. Die verzögerte Spaltung von Saccharose wirkte sich auch auf die Effizienz der 5-KF-Produktion aus. Obwohl *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh}\Delta\text{sgdh}::\text{fdh inv}$  deutlich höhere FDH-Aktivitäten zeigte und ausgehend von Fruktose eine bessere Produktivität aufwies, konnten aus dem Substrat Saccharose nur vergleichbare Effizienzen zu *G. oxydans*  $\Delta\text{mgdh}::\text{fdh inv}$  erzielt werden (Abb. 56 B). Eine Verbesserung zum bisherigen Ein-Stamm-System lag somit nicht vor. Dies konnte auch in den Kulturüberständen der Doppelintegrationsmutante *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* nachgewiesen werden, obwohl auch dieser Stamm bereits für eine optimierte Produktion von 5-KF aus Fruktose eingesetzt wurde (Battling et al. 2020) (Abb. 56 B). Eine Wiederholung des Versuchsansatzes mit

einer Verringerung des pH-Wertes in der Kultivierung auf pH 5,5 führte ebenfalls nicht zu einer Verbesserung der Saccharosespaltung (Daten nicht gezeigt), obwohl die maximale Aktivität der Invertase1417 bei einem pH-Wert von 5 lag (vgl. Kapitel 3.2.4).



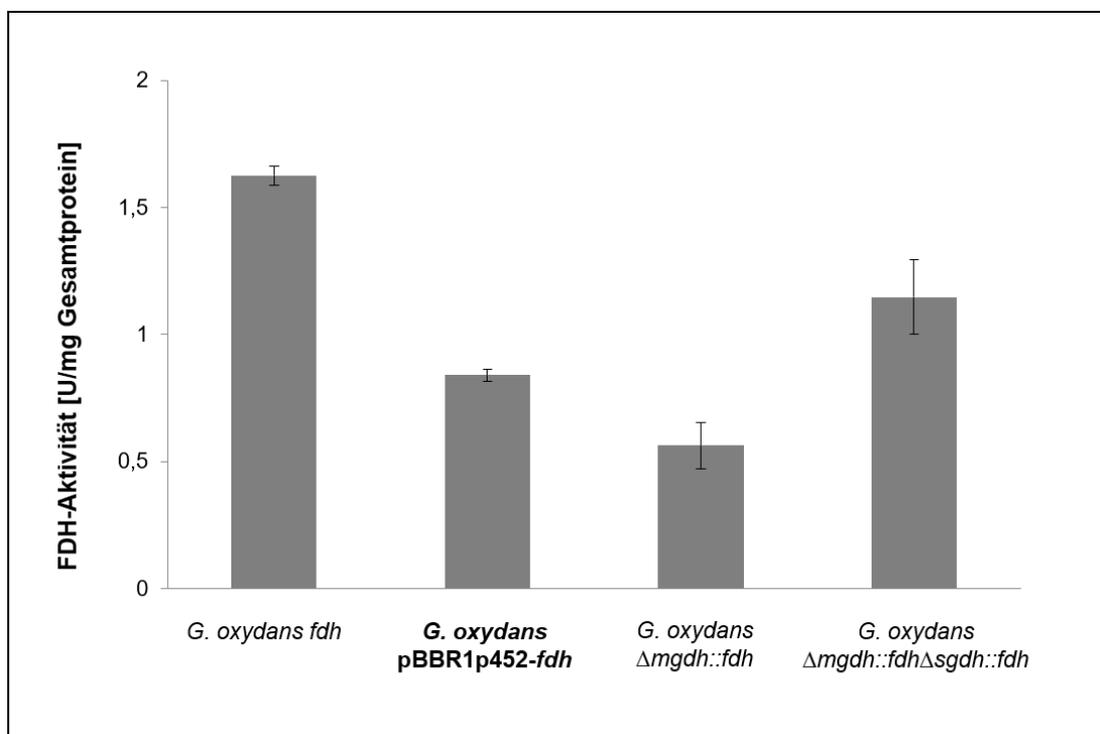
**Abbildung 56:** Vergleich von Saccharosespaltung und 5-KF-Produktion durch verschiedene FDH-Integrationsstämme. Dargestellt sind die Verläufe der Stämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh\ inv$  (●), *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* (□) und der Einzelintegrationsmutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  (○) bei einer Kultivierung in YS-Medium mit 100 mM Saccharose bei pH 6,5 und 30 °C. A: Abnahme der Saccharosekonzentration durch die heterolog produzierte Invertase. B: 5-KF-Produktion aus Saccharose.

### 3.5.3.2 Optimierung der Saccharosespaltung durch Integration von *inv1417* ins Genom

Die Ergebnisse der vorherigen Kapitel ließen vermuten, dass die erhöhte heterologe Produktion der membrangebundenen Fruktose-Dehydrogenasen in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh\ inv$  zu einer verminderten Produktion der Invertase oder zu einem geringeren Transport des Proteins über die Cytoplasmamembran führte. Für die zweite Förderungsphase des 5-KF-Forschungsvorhabens war daher eine Umstrukturierung des Systems durch Integration von *inv1417* in das Genom von *G. oxydans* geplant. Die Expression des *fdhSCL*-Genclusters könnte dann Plasmid-vermittelt

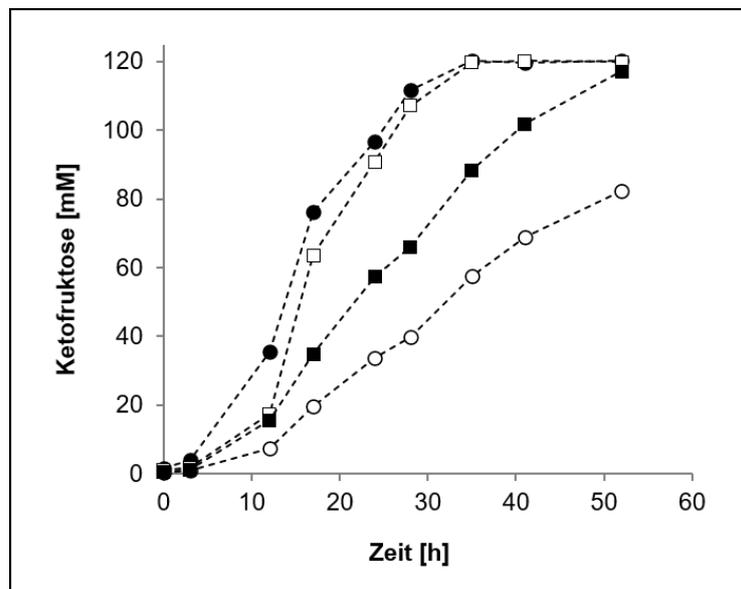
erfolgen. Sollte die vermehrte Produktion der in der Cytoplasmamembran lokalisierten FDH im Doppelintegrationsstamm zu einem geringeren Transport der Invertase in das Periplasma geführt haben, wäre neben dem bisher verwendeten starken, konstitutiven Promotor p264, der Einsatz des moderaten p452-Promotors (Kallnik et al. 2010) sinnvoll.

Um einen Grundstein für diese Modifizierungen zu legen, wurden in dieser Arbeit Analysen zur Effizienz der heterologen FDH-Produktion unter Verwendung des Plasmids pBBR1p452-*fdhSCL*-ST (Siemen 2017) durchgeführt. Dafür wurde das Konstrukt in *G. oxydans* transformiert und die Aktivität der FDH im so erstellten Stamm *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 3.4.2). Um vergleichbare Ergebnisse unter identischen Versuchsbedingungen zu erhalten, wurde die FDH-Aktivität ebenfalls in den Stämmen *G. oxydans fdh*, *G. oxydans Δmgdh::fdh* und *G. oxydans Δmgdh::fdhΔsgdh::fdh* ermittelt. Aus dieser Analyse ging hervor, dass die höchste Aktivität in *G. oxydans fdh* mit einem Wert von  $1,63 \pm 0,02$  U/mg Gesamtzellprotein vorlag (Abb. 57). Dies war zu erwarten, da der Stamm das Plasmid pBBR1p264-*fdhSCL*-ST mit dem starken Promotor p264 trug. Durch Einsatz des moderaten Promotors p452 in *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* verringerte sich die FDH-Aktivität auf  $0,84 \pm 0,01$  U/mg Gesamtprotein. Das Plasmid-basierte System mit p452-Promotor überstieg damit die Aktivität des bisherigen Ein-Stamm-Systems, für das ein Wert von  $0,56 \pm 0,06$  U/mg Gesamtzellprotein ermittelt wurde (Abb. 57). Die FDH-Aktivität lag entsprechend zwischen jener der Stämme *G. oxydans Δmgdh::fdh* und *G. oxydans Δmgdh::fdhΔsgdh::fdh*, wodurch das Plasmid pBBR1p452-*fdhSCL*-ST potentiell für den Einsatz zur heterologen Proteinproduktion im Zuge der 5-KF-Synthese geeignet war.



**Abbildung 57:** FDH-Aktivität in *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh*. Die photometrische Bestimmung erfolgte mit Fruktose als Substrat und 0,15 mM DCPIP sowie 0,65 mM PMS als Ekelkronenakzeptoren. Die Reduktion von DCPIP wurde über die Absorptionsabnahme bei 600 nm ermittelt. Die Oxidation von 1.0  $\mu$ mol Fruktose pro min pro mg Gesamtprotein ist als eine Unit (U) der Proteinaktivität angegeben.

Eine Bestimmung der Effizienz von *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* hinsichtlich der Menge an gebildeter 5-KF erfolgte durch eine Kultivierung in Fruktose-haltigem Medium. Erneut wurden zum direkten Vergleich die Stämme *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh $\Delta$ *sgdh::fdh*, *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* und *G. oxydans* *fdh* mitgeführt. Die Analyse der Kulturüberstände erfolgte mittels HPLC. Nach einer Kultivierungsdauer von 50 h konnte eine vollständige Umsetzung von 120 mM Fruktose zu 5-KF durch *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* detektiert werden, die in den Stämmen *G. oxydans* *fdh* und *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh $\Delta$ *sgdh::fdh* bereits nach 30 h vorlag (Abb. 58). Diese Beobachtungen entsprachen aufgrund der ermittelten FDH-Aktivität den Erwartungen. Verglichen mit dem bisherigen Ein-Stamm-System *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh*, lag damit jedoch eine Optimierung der Produktmenge und der Produktionszeit vor. *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* wies über den gesamten Kultivierungszeitraum eine Substratoxidation von 1,6 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> auf, in *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* wurde hingegen ein Wert von 2,2 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ermittelt. Durch *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* fand zudem eine vollständige Umsetzung der verfügbaren Fruktoseeinheiten zu 5-KF statt, da in Kulturüberständen des Stammes zum Ende des Experimentes keine verbleibende Fruktose nachgewiesen werden konnte. Die Analyse von *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* hingegen zeigte eine Restfruktosemenge von 41 mM im Medium (Abb. 58). Anhand dieser Daten kann festgehalten werden, dass das Plasmid pBBR1p452-*fdh*SCL-ST zur Produktion von 5-KF in *G. oxydans*, im Zuge einer Modifizierung des bisherigen Ein-Stamm-Systems eingesetzt werden kann.**

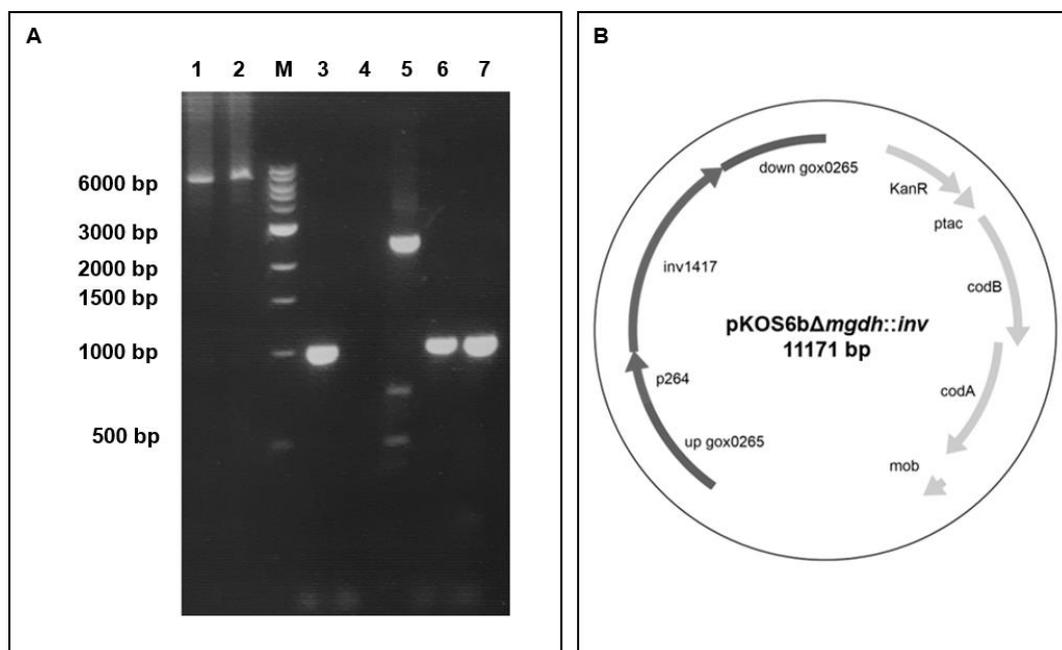


**Abbildung 58:** Fruktosemetabolismus in *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh*. Um die Effizienz von *G. oxydans* pBBR1p452-*fdh* (■) zu ermitteln, wurde die 5-KF-Produktion im direkten Vergleich zu den Stämmen *G. oxydans* *fdh* (□), *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh $\Delta$ *sgdh::fdh* (●) und *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* (○) bestimmt. Die Kultivierung erfolgte in YF-Medium mit 120 mM Fruktose, pH 6,5, bei 30 °C für 50 h.*

Zur weiteren Vorbereitung der Modifizierung des Ein-Stamm-Systems im Zuge der zweiten Förderungsphase des 5-KF-Forschungsprojekts, wurden in dieser Arbeit Deletionsvektoren zur chromosomalen Integration von *inv1417* erstellt (vgl. Kapitel 4.8.2). Da nicht vorhersehbar war, ob eine einzelne Genomintegration zu einer ausreichend hohen heterologen Proteinproduktion von

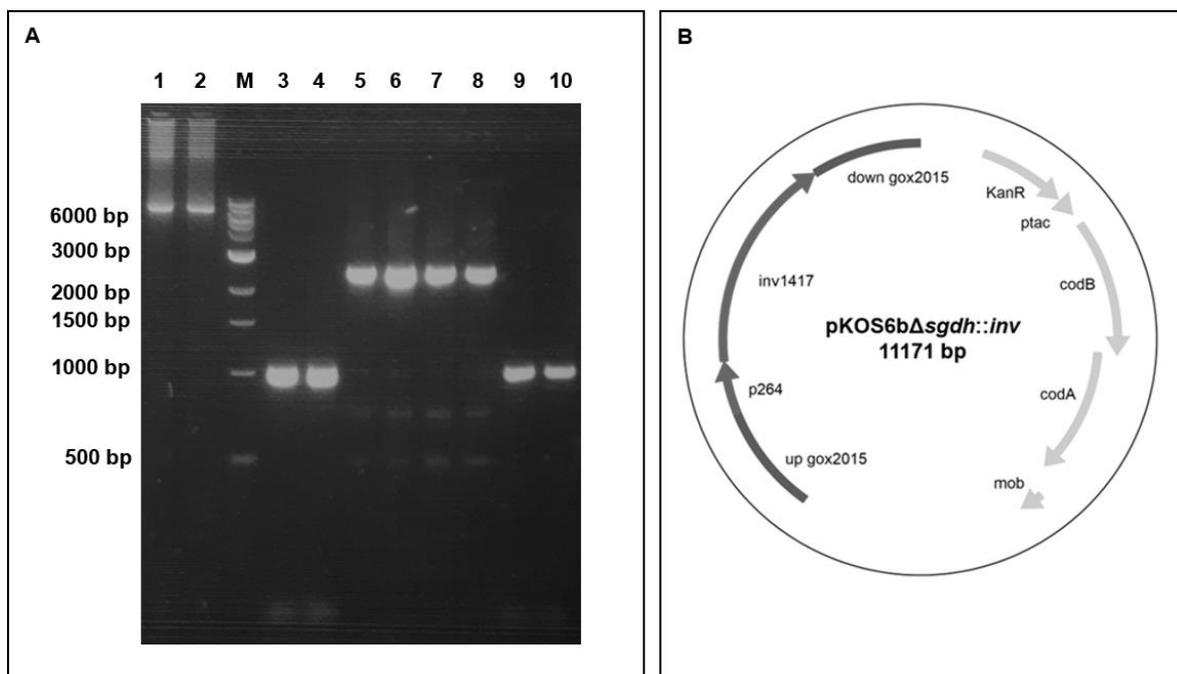
Inv1417 führt, erfolgte die Generierung zweier Konstrukte parallel. Nachdem sich in vorherigen Versuchen die Integrationsorte der Gene *gox0265* und *gox2015* als geeignet erwiesen und eine Deletion dieser Gene zusätzlich den Einsatz einer Glukose-Isomerase begünstigen, wurden beide erneut ausgewählt. Die Konstruktion der Deletionsplasmide erfolgte mit dem bisherigen Prinzip der Assemblierung (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Die Primer wurden wie zuvor durch das NEBuilder® Assembly Tool generiert (vgl. Kapitel 2.3.9 und 3.4.5.1).

Für das Plasmid *pKOS6bΔmgdh::inv* konnten alle vier DNA-Fragmente amplifiziert werden. Unter Verwendung der Primer *pKOS6b.F/R* wurde im Agarosegel ein Fragment oberhalb der 6000 bp-Markerbande detektiert, was der erwarteten Größe des Vektorrückgrats mit 6686 bp entsprach (Abb. 59 A, Spur 1,2). Die flankierenden Fragmente stromaufwärts (Abb. 59 A, Spur 3) und stromabwärts (Abb. 59 A, Spur 6 und 7) von *gox0265* konnten mit 1000 bp generiert werden, was mit der berechneten Größe von 1030 bp bei Einsatz der Primer *up-0265.inv-F/R* bzw. *down-0265.inv-F/R*, übereinstimmte. Das letzte Amplifikat, *p264-inv1417*, konnte mit einer passenden Größe von 2502 bp erstellt werden (Abb. 59 A, Spur 5). Nach erfolgter Verknüpfung der Fragmente unter Verwendung des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes (vgl. Kapitel 2.3.9.1), wurde das fertige Konstrukt *pKOS6bΔmgdh::inv* (Abb. 59 B) in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen eingebracht und vervielfältigt. Durch eine Sequenzierung wurde die korrekte Basenfolge des Plasmids abschließend bestätigt.



**Abbildung 59:** Klonierungsschema zur Generierung von *pKOS6bΔmgdh::inv*. A: Visualisierung aller Amplifikate im Agarosegel. DNA von *pKOS6b* mit einer Größe von 6689 bp (Spur 1, 2). M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Amplifikate oberhalb der Gensequenz von *gox0265* mit 1030 bp (Spur 3) sowie unterhalb von *gox0265* (Spur 6, 7). In Spur 5 ist das DNA-Fragment *p264-inv1417* mit der berechneten Größe von 2502 bp dargestellt. B: Plasmid *pKOS6bΔmgdh::inv* zur Deletion des Gens *gox0265* und chromosomalen Integration von *inv1417*. Auf dem Vektorrückgrat sind ein *tac*-Promotor (*ptac*), eine Kanamycin-Resistenzkassette (*KanR*), die Gensequenzen der Cytosin-Deaminase (*codA*) und der Cytosin-Permease (*codB*) sowie ein Mobilitätsgen (*mob*) enthalten.

Die Konstruktion des zweiten Deletionsplasmids  $pKOS6b\Delta sgdh::inv$  erfolgte unter Verwendung der Primer  $pKOS6b.F/R$ ,  $up-2015.inv-F/R$ ,  $down-2015.inv-F/R$  und  $p264-inv1417.2015-F/R$ , wodurch alle benötigten Amplifikate generiert werden konnten. Im zugehörigen Agarosegel wurden zwei spezifische DNA-Fragmente oberhalb der 6000 bp-Markerbande (Abb. 60 A, Spur 1,2) dem  $pKOS6b$ -Vektorrückgrat zugeordnet, für das die berechnete Größe bei 6689 bp lag. Die up- und down-Fragmente konnten mit einer Größe von jeweils 1030 bp nachgewiesen werden (Spur 3 und 4, bzw. 9 und 10), sowie das Amplifikat für  $p264-inv1417$  mit 2500 bp (Abb. 60 A, 5 - 8). Nach einer Assemblierung nach dem in Kapitel 2.3.9.1 beschriebenen Prinzip, erfolgte die Transformation des fertigen Plasmids  $pKOS6b\Delta sgdh::inv$  (Abb. 60 B) in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen. Mit Hilfe einer Sequenzierung wurde die vollständige und korrekte Konstruktion des Deletionsvektors bestätigt.



**Abbildung 60:** Konstruktion des Deletionsvektors  $pKOS6b\Delta sgdh::inv$  für eine zweite Integration von *inv1417* ins Genom von *G. oxydans*. A: Amplifizierung der vier benötigten DNA-Stücke. Dargestellt sind zwei Fragmente für den Vektor  $pKOS6b$  (6689 bp) in Spur 1 und 2, das Amplifikat up-*gox2015* (1030 bp) in Spur 3 und 4, das Integrationsfragment  $p264-inv1417$  (2502 bp) in den Spuren 5-8 sowie die DNA von down-*gox2015* in 9 und 10. M: 1 kb DNA-Marker der Firma NEB (Frankfurt am Main, Deutschland). B: Deletionsplasmid nach Verknüpfung der einzelnen Fragmente. Im Vektorrückgrat befinden sich die Gensequenzen für die Cytosin-Deaminase (*codA*) und die Cytosin-Permease (*codB*), eine Kanamycinresistenz (*KanR*) sowie der Promotor *ptac* und ein Mobilitätsgen (*mob*).

Durch die Deletionsplasmide  $pKOS6b\Delta mgdh::inv$  und  $pKOS6b\Delta sgdh::inv$ , die in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden, konnte eine Grundlage für eine mögliche Umstrukturierung des Ein-Stamm-Systems im Zuge der zweiten Förderungsphase des 5-KF-Forschungsvorhabens im Jahr 2021 geschaffen werden.

## 4. Diskussion

Mit dem heutigen Forschungsstand können immer mehr Krankheiten auf einen übermäßigen Konsum von Zuckern und eine hoch-kalorische Ernährungsweise zurückgeführt werden (Montonen et al. 2007; Brownell et al. 2009; Malik und Hu 2012; MacDonald 2016; Mooradian et al. 2017). Der häufige Verzehr zuckerreicher Lebensmittel wirkt sich beispielsweise ungünstig auf die Zahngesundheit aus und fördert die Bildung von Karies (Woodward und Walker 1994; Burt und Pai 2001; Marshall et al. 2007; Tandel 2011). Ein übermäßiger Zuckerkonsum steht jedoch auch im Zusammenhang mit der Entstehung von Übergewicht, Fettleibigkeit und Diabetes melitus Typ 2 (Nielsen und Popkin 2004; Montonen et al. 2007; Hu und Malik 2010; MacDonald 2016; Stanhope 2016). In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz der genannten Krankheitsbilder enorm zugenommen, weshalb diese mittlerweile zu den größten gesundheitlichen Problemen der heutigen Gesellschaft zählen (Montonen et al. 2007; Malik et al. 2006; Hu und Malik 2010). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) hat sich das weltweite Auftreten von Fettleibigkeit seit 1975 fast verdreifacht. Im Jahr 2016 litten 39 % aller Erwachsenen weltweit an Übergewicht sowie 13 % an Fettleibigkeit. Dies betraf zudem 0,7 % aller Kinder unter 5 Jahren im Jahr 2019 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, aktueller Stand von April 2020). Die Anzahl der Diabeteserkrankungen ist sogar fast um das Vierfache gestiegen. Während die Stoffwechselstörung 1980 weltweit bei etwa 108 Millionen Menschen diagnostiziert wurde, waren im Jahr 2014 schon 422 Millionen Menschen erkrankt (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>, aktueller Stand von Juni 2020). Die Zunahme dieser Krankheitsbilder resultiert auch in einem Anstieg schwerwiegender Folgeerkrankungen. Übergewicht und Fettleibigkeit können die Entstehung von Herzkrankheiten, Schlaganfällen, Arthritis, Diabetes und verschiedene Arten von Krebs fördern, während eine Diabeteserkrankung das Risiko einer Erblindung sowie Leberversagen und Herzinfarkten erhöht (Trautner et al. 1997; Bianchini et al. 2002; Kanchaiah et al. 2002; Barrett-Connor 2003; El-serag et al. 2004; Sarwar et al. 2010).

Einen Grund für die Aufnahme hoher Zuckermengen, vor allem Saccharose und Fruktose (Abb. 61 A), stellt der Zusatz dieser Stoffe in Konsumgütern, wie beispielsweise süße Getränke, Backwaren und Fertigprodukte durch die Lebensmittelindustrie dar (Livesey und Taylor 2008; Hu und Malik 2010; Malik et al. 2010; Aragno und Mastrocola 2017; Carochio et al. 2017). Dadurch wird eine Geschmacksverbesserung der Produkte erreicht, was zu einem erhöhten Verzehr führt (Wang et al. 2009; Fortuna 2012; Blum et al. 2014) und die Verkaufszahlen steigert (Carochio et al. 2017). Vor allem Cola, Limonade und Säfte werden in der heutigen Gesellschaft nahezu jeden Tag und in hohen Mengen verzehrt und erhöhen daher auch die tägliche Zuckeraufnahme enorm (Hu und Malik 2010; Malik et al. 2010). Dadurch bestehen (am Beispiel der USA) etwa 30 % der aufgenommen Kohlenhydrate aus Zuckerezusätzen (Welsh et al. 2010), was die empfohlene Menge der WHO um mehr als das Dreifache übersteigt (Mooradian et al. 2017).

Das zunehmende Bewusstsein der Weltbevölkerung über die negativen Gesundheitsfolgen im Zusammenhang mit einer zuckerreichen Ernährung führt zu einer erhöhten Nachfrage an gesünderen Alternativen (Malik et al. 2006; Brownell et al. 2009; Fung et al. 2009; Malik et al. 2010; Yang et al. 2014; Aragno und Mastrocola 2017). Der Austausch kalorienreicher Zucker in Konsumgütern durch kalorienarme oder kalorienfreie Süßstoffe ist in diesem Zusammenhang von großem Interesse (Montonen et al. 2007; Vartanian et al. 2007; Blum et al. 2014; Mooradian et al. 2017). Daher beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Generierung und Optimierung eines Expressionsstammes zur Synthese des alternativen Süßungsmittels 5-KF im industriellen Maßstab.

## **4.1 Einsatz von Zuckerersatzstoffen in Lebensmitteln**

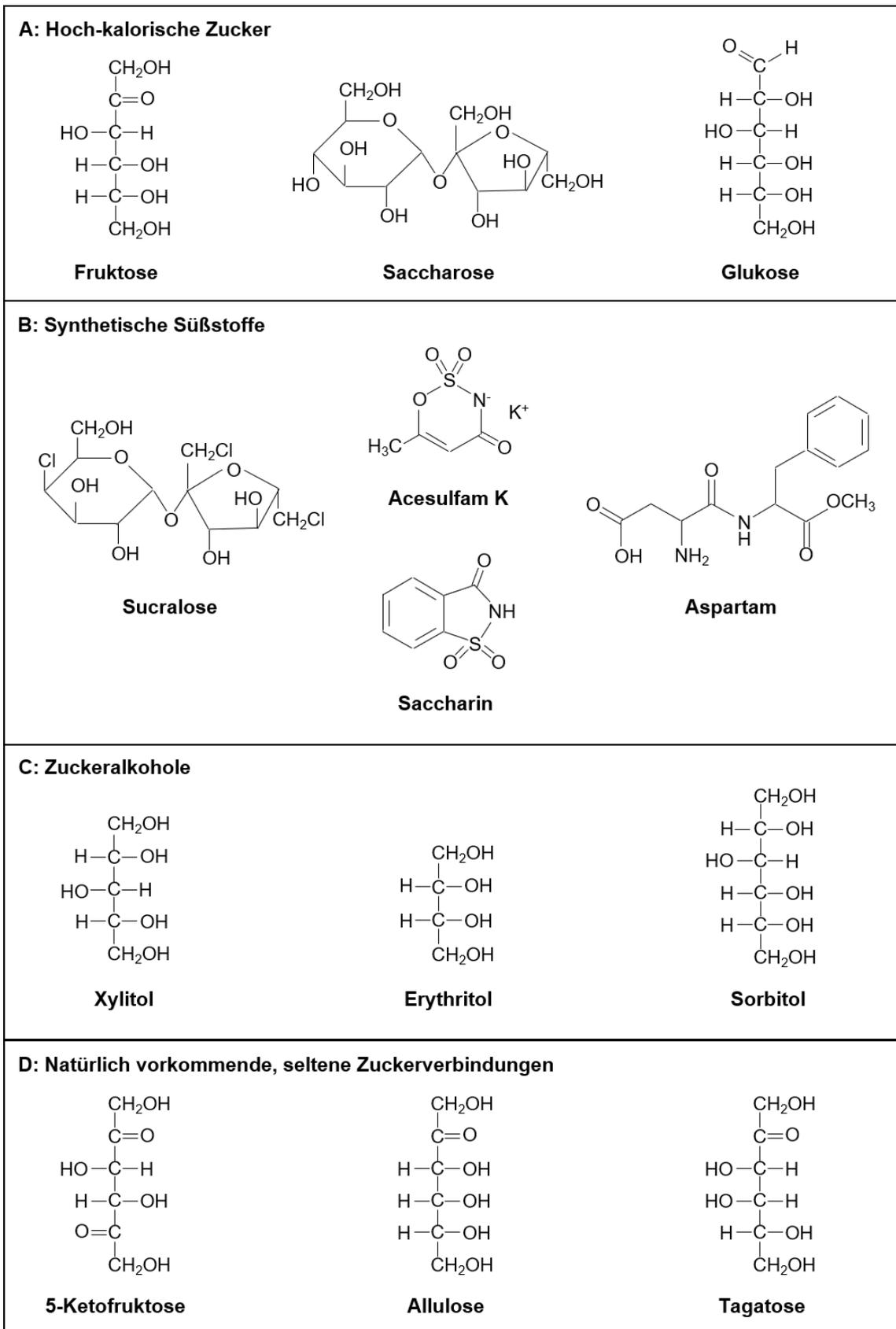
### **4.1.1 Synthetisch hergestellte Süßstoffe**

Süßungsmittel synthetischer Herkunft sind durch eine extrem hohe Süßkraft charakterisiert (hochintensive Süßstoffe), die in Relation zu Saccharose gemessen wird. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem Acesulfam K, Aspartam und Saccharin, deren Süßkraft 200- bis 300-mal so hoch ist wie Saccharose sowie die etwa 800-mal süßere Sucralose (Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017) (Abb. 61 B). Ein Vorteil dieser hohen Intensität ist, dass alle genannten Verbindungen nur in geringen Mengen ins Lebensmittel eingesetzt werden müssen und deshalb keinen kalorischen Wert besitzen (Cardello et al. 1999; Kuhn et al. 2004; Mooradian et al. 2017).

Acesulfam K, Saccharin und Sucralose werden als kalorienfreie Alternative zu Fruktose und Saccharose in Fruchtsäften, verarbeiteten Früchten, Marmeladen, Süßigkeiten und Backwaren oder als Süßstoff für Kaffee und Tee eingesetzt (Whysner und Williams 1996; Takayama et al. 1998; Swithers 2013; Carocho et al. 2017). Alle drei Verbindungen können nicht vom Menschen verstoffwechselt werden, weshalb diese unverändert über den Urin ausgeschieden werden (Shankar et al. 2013; Carocho et al. 2017). Lebensmittel, die durch Acesulfam K, Saccharin oder Sucralose gesüßt wurden, weisen jedoch einen bitteren, künstlichen Nachgeschmack auf, der einen Nachteil dieser Verbindungen darstellt (Kuhn et al. 2004; Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017). Aspartam zeichnet sich hingegen durch eine angenehme Süße aus und wird daher gegenüber den anderen genannten Verbindungen bevorzugt in Lebensmitteln eingesetzt (Carocho et al. 2017). Das bekannteste Beispiel ist die Verwendung des Süßstoffs in Pepsi-Cola, die aufgrund des Geschmacks besonders beliebt bei den Konsumenten ist (Carocho et al. 2017). Dem entgegen steht jedoch eine unklare und immer wieder hinterfragte Gesundheitslage. Aspartam besteht aus den Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure, die über eine Methylesterbindung miteinander verknüpft sind (Shankar et al. 2013; Carocho et al. 2017). Der Einsatz des Süßstoffs in Lebensmitteln muss entsprechend besonders gekennzeichnet werden, da der Verzehr für Menschen mit Phenylketonurie nicht empfohlen wird (Shankar et al. 2013). Die Verbindung steht zudem im Verdacht, auch für gesunde Konsumenten negative Auswirkungen zu haben. Einige Studien deuten beispielsweise darauf hin, dass der Einsatz in Lebensmitteln mit

einem pH-Wert über 6 zur Bildung von Diketopiperazin führen kann und dadurch als krebserregend gelten könnte (George et al. 2010; Rycerz und Jaworska-Adamu 2013). Auch Toxizitätsstudien an Mäusen und Ratten bieten viele Anhaltspunkte für gesundheitliche Risiken, da Aspartam sich in diesen Tieren als giftig für Nieren und Leber herausgestellt hat. Diese Studien formulierten außerdem eine potentiell krebserregende Wirkung und eine Schädigung der Nerven (Soffritti et al. 2010; Ashok et al. 2014; Saleh 2014; Okasha 2016). Zudem konnte eine häufige Einnahme dieses Süßstoffs mit Veränderungen der Darmmikrobiota in Verbindung gebracht werden und zu Glukoseintoleranzen führen (Suez et al. 2014). Weiterhin wurden Interaktionen mit Geschmacksrezeptoren entdeckt, die eine Insulinsekretion auslösen und damit das Risiko von Typ-2-Diabetes erhöhen können (Murray et al. 2016; Pepino 2015). Andere Studien hingegen belegten die Sicherheit von Aspartam (Kirkland und Gatehouse 2015). Auch für Acesulfam K, Saccharin und Sucralose wurden potentielle negative Auswirkungen auf die Gesundheit durch einen regelmäßigen Verzehr untersucht. Da viele Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, ist eine eindeutige Einschätzung jedoch nur schwer möglich. Für Acesulfam K und Saccharin wurden in einigen Untersuchungen allgemeine Unverträglichkeiten in Folge eines übermäßigen Konsums beschrieben (Carocho et al. 2017). Ein Verzehr von Sucralose in hohen Mengen konnte in Studien mit dem Auftreten von Migräne, Beschwerden des Magen- und Darmtraktes sowie einer Hemmung des Wachstums wichtiger Darmbakterien in Verbindung gebracht werden (Carocho et al. 2017). Andere Untersuchungen beschrieben hingegen ein geringes gesundheitliches Risiko durch den Konsum von Sucralose und befürworten den Einsatz als Zuckerersatz in Lebensmitteln (Grotz und Munro 2009; Berry et al. 2016). Eine Toxizität konnte für Acesulfam K, Saccharin und Sucralose ausgeschlossen werden (Shankar et al. 2013, Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017).

Die widersprüchliche Datenlage zu den potentiellen Folgen eines regelmäßigen Verzehrs synthetischer Süßungsmittel sorgt vermehrt zu Misstrauen und Unsicherheiten bei Konsumenten (Paolini et al. 2017). Neben der unklaren Gesundheitsgefährdung liegt dies vor allem an dem mit dem Verzehr verbundenen, häufig beschriebenen künstlichen oder bitteren Nachgeschmack (Kuhn et al. 2004; Chattopadhyay et al. 2014). Zudem muss auch die Auswirkung und Prävalenz von Saccharin, Acesulfam K und Sucralose auf die Umwelt bedacht werden (Carocho et al. 2017). Dies ist vor allem relevant, da eine Verstoffwechslung durch den Menschen und die Darmmikrobiota nicht erfolgen kann und die Verbindungen somit unverändert über den Urin ausgeschieden werden und in großen Mengen in die Abwässer gelangen (Shankar et al. 2013; Carocho et al. 2017; Yin et al. 2017). Besonders die chlororganische Verbindung Sucralose kann in der Umwelt nur sehr langsam abgebaut werden (Shankar et al. 2013; Carocho et al. 2017; Yin et al. 2017). Zusammengefasst wird deutlich, dass die kalorienersparende Eigenschaft der Verbindungen die Nachteile dieser nicht überwiegt, weshalb die Nachfrage an gesünderen, natürlich vorkommenden Zuckeralternativen mit süßem Geschmack stetig steigt (Weihrauch und Diehl 2004; Philippe et al. 2014; Paolini et al. 2017; Carocho et al. 2017).



**Abbildung 61:** Übersicht über die Strukturformeln hochkalorischer Zucker im Vergleich zu synthetischen und natürlichen Süßungsmitteln als Zuckeralternative. A: Darstellung der kalorienreichen Zucker Fructose, Saccharose und Glukose. B: Strukturformeln der in dieser Arbeit thematisierten synthetischen Süßstoffe. C: Die Zuckeralkohole Xylitol, Erythritol und Sorbitol als natürliche Zuckerersatzstoffe. D: Natürlich vorkommende seltene Zucker, darunter 5-KF, Allulose und Tagatose.

#### 4.1.2 Zuckerersatzstoffe natürlicher Herkunft

Pflanzliche Süßungsmittel gelten allgemein aufgrund ihres natürlichen Vorkommens in einigen Konsumgütern als weniger gesundheitsgefährdend und verträglicher (Philippe et al. 2014; Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017), weshalb die Suche nach solchen Verbindungen in den letzten Jahren stark zugenommen hat. Generell besitzen natürliche Zuckerersatzstoffe im Vergleich zu synthetischen Süßungsmitteln einen kalorischen Wert, sind dafür aber durch eine natürliche Süße ohne künstlichen Nachgeschmack charakterisiert. Der Kaloriengehalt ist jedoch um ein Vielfaches geringer als jener von Fruktose und Saccharose.

Eine Ausnahme unter den natürlichen Süßstoffen bilden Steviolglykoside, die aus Blättern der Pflanze *Stevia rebaudiana* extrahiert werden können (Brandle et al. 1998; Kroyer 2010; Shankar et al. 2013; Samuel et al. 2018). Da diese Verbindungen durch eine hohe Süßkraft charakterisiert sind (300-mal intensiver als Saccharose), müssen nur geringe Mengen in Lebensmitteln eingesetzt werden, weshalb Steviolglykoside als kalorienfrei deklariert werden können (Kroyer 2010; González et al. 2014; Hellfritsch et al. 2012; Mooradian et al. 2017). Genau wie synthetische Süßungsmittel weisen Steviolglykoside jedoch einen stark bitteren und sehr künstlichen Nachgeschmack auf (Savita et al. 2004; Yadav et al. 2011; Espinoza et al. 2014). Um einen besseren Geschmack zu erzeugen, werden Lebensmittel häufig zusätzlich mit Fruktose versehen, wodurch diese Produkte im Endeffekt nur 20 - 50 % weniger Zucker enthalten (Gao et al. 2016; DuBois und Prakash 2012; Samuel et al. 2018). Steviolglykoside stellen daher keine optimale Zuckeralternative dar. Die Zuckeralkohole Xylitol, Sorbitol und Erythritol (Abb. 61 C) sind in geringen Mengen natürlicherweise in Früchten und Beeren vorhanden (Ghosh und Sudha 2012). Ihre Süßkraft liegt, in Abhängigkeit der jeweiligen Verbindung, zwischen 40 - 90 % in Relation zu Saccharose (Chattopadhyay et al. 2014; Mooradian et al. 2017). Im Vergleich zu synthetischen Süßungsmitteln führt ein Austausch herkömmlicher Zucker durch diese Zuckeralkohole nur zu einer leichten Reduktion der Kalorien (Munro et al. 1998; Chattopadhyay et al. 2014). Auch die in geringen Mengen in der Natur vorkommenden, seltenen Zucker Allulose und Tagatose (Abb. 61 D) eignen sich als Ersatz von Saccharose und Fruktose in Lebensmitteln (Izumori 2002, Levin 2002; Sun et al. 2007). Tagatose ist natürlicherweise in pulverisierter Kuhmilch, Kakao und einer Vielzahl von Käsesorten, Joghurts und anderen Milchprodukten vorhanden (Richards und Chandrasekhara 1960; Troyano et al. 1992; Mendoza et al. 2005; Oh 2007). Dieser seltene Zucker hat einen geringen kalorischen Wert, da die Verbindung nur teilweise vom Menschen verstoffwechselt werden kann (Normén et al. 2001). Tagatose ist außerdem von einigen Darmbakterien zu kurzkettigen Fettsäuren metabolisierbar, die anschließend im Darm des Konsumenten resorbiert und als C-Quelle genutzt werden (Normén et al. 2001). Das Fruktosederivat Allulose kommt in der Natur in sehr geringen Mengen in getrockneten Feigen, Kiwis und Rosinen vor (Zhang et al. 2016). Die Verbindung besitzt 70 % der Süßkraft von Saccharose und gilt als sehr kalorienarm, da nur geringe Mengen metabolisiert werden können (Hossain et al. 2015; Zhang et al. 2016). Xylitol, Sorbitol und Erythritol, als auch Tagatose und Allulose können außerdem nach dem bisherigen Forschungsstand nicht von

Bakterien der Oralflora metabolisiert werden, weshalb diese Verbindungen als zahnfreundlich gelten (Levin 2002; Mooradian et al. 2017). Zudem sind diese Süßstoffe durch einen natürlichen Zuckergeschmack charakterisiert, was einen Vorteil gegenüber Stevioglykosiden, Acesulfam K, Sucralose und Saccharin darstellt (Chattopadhyay et al. 2014). Auch die Auswirkungen eines übermäßigen Verzehrs auf die menschliche Gesundheit sind in allen Fällen im Vergleich zu synthetischen Süßstoffen geringer. Dennoch wurden bei einem erhöhten Konsum von Xylitol, Sorbitol oder Erythritol Magen-Darm-Beschwerden und Durchfall beschrieben (Mooradian et al. 2017). Tagatose besitzt bereits den GRAS-Status und der Verbindung konnten auch bei einer übermäßigen Einnahme keine toxischen Effekte oder negative Auswirkungen auf den Magen-Darm-Trakt zugeschrieben werden (Levin 2002). Allulose steht derzeit vermehrt im Interesse der Forschung und Lebensmittelindustrie. Der Einsatz des Süßstoffs in Konsumgütern gilt bisher aufgrund der Ergebnislage in Fütterungsstudien an Ratten als unbedenklich (Mu et al. 2012). In mehreren Studien wurden auch bei hohen Verzehrsmengen bislang keine Nebenwirkungen oder negative Auswirkungen auf den Magen-Darm-Trakt beobachtet (Hossain et al. 2015; Zhang et al. 2016).

Durch den Einsatz natürlicher Süßungsmittel in Lebensmittel kann das Risiko von Zucker-assoziierten Erkrankungen sowie eine übermäßige Kalorienzufuhr reduziert werden. Obwohl diese Verbindungen, mit Ausnahme von Stevia, einen eigenen kalorischen Wert aufweisen, besitzen sie einige Vorteile gegenüber den kalorienfreien synthetischen Süßstoffen. Dazu zählt der natürlich süße Geschmack, ohne bitteren oder künstlichen Nachgeschmack (Ausnahme Stevia), aber auch ein geringeres Gesundheitsrisiko bei regelmäßigem Verzehr. Vor allem natürlich vorkommende, seltene Zucker, wie Allulose und Tagatose weisen in diesem Punkt deutliche Vorteile gegenüber allen anderen Verbindungen auf. Daher ist die Suche nach weiteren kalorienarmen, natürlich vorkommenden, seltenen Zuckerverbindungen mit neutralem Geschmack und die Entwicklung geeigneter Produktionsprozesse aktuell von großer Bedeutung (Weihrauch und Diehl 2004; Philippe et al. 2014; Carocho et al. 2017; Mooradian et al. 2017).

#### **4.1.3 Die natürliche Verbindung 5-KF als alternatives Süßungsmittel**

Eine vielversprechende Alternative zu den kalorienreichen Zuckern Saccharose, Glukose und Fruktose sowie den synthetischen und den genannten natürlichen Süßstoffen, stellt 5-KF dar. Das Derivat der Fruktose (vgl. Abb. 61 D) zählt wie Allulose und Tagatose zu den natürlich vorkommenden, seltenen Zuckern und weist daher ein großes Potential auf. Um die Verbindung als Lebensmittelzusatz nutzbar zu machen, wurde im Zuge dieser Arbeit ein Prozess entwickelt, der die industrielle Produktion von 5-KF aus den kalorienreichen Zuckern Fruktose und Saccharose ermöglichte.

##### **4.1.3.1 Eigenschaften von 5-KF und Vorkommen in der Natur**

Das alternative Süßungsmittel 5-KF kann in verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen werden, darunter Essig, Rot- und Weißwein, Traubensaft, Holunderblütensirup und Honig (Burroughs und

Sparks 1973; Barbe et al. 2001; Blasi et al. 2008; Siemen 2017). Als natürlicher Inhaltsstoff gilt 5-KF als wesentlich verträglicher als beispielsweise synthetische Produkte. Die Verbindung zeichnet sich zudem durch einen natürlich süßen Geschmack, ohne bitteren Nachgeschmack, aus. Mit Hilfe eines Sensorik-Panels konnte bestimmt werden, dass 5-KF nachweislich süßer ist als Saccharose und eine vergleichbare Intensität und Süße zu Fruktose aufweist (Stone und Oliver 1969; Herweg et al. 2018). Der Schwellenwert der Süßkraft des alternativen Süßstoffs lag mit 16,4 mmol/L geringfügig höherer als jener von D-Fruktose mit 10,2 mmol/L. Innerhalb der sensorischen Tests war daher eine Unterscheidung der beiden Substanzen hinsichtlich ihrer Süßkraft nicht möglich (Herweg et al. 2018). Diese Eigenschaften unterstreichen das Potential von 5-KF als optimales Süßungsmittel. Der natürlich süße Geschmack und das Vorkommen in der Natur stellt dabei nicht nur einen Vorteil gegenüber synthetischen Süßungsmitteln und Steviolglykosiden dar, sondern ist auch eine wichtige Voraussetzung für die Akzeptanz der Verbraucher (Herweg et al. 2018).

#### **4.1.3.2 Verstoffwechslung und kalorischer Wert von 5-KF**

Eine entscheidende Rolle für die Eignung einer Verbindung als alternatives Süßungsmittel spielt die Verstoffwechslung im menschlichen Körper. Zur Verwertbarkeit von 5-KF lagen vergleichend zu der Metabolisierung von Fruktose bereits erste Ergebnisse vor, die das Potential des Süßstoffs weiter unterstreichen. Fruktose wird im Menschen hauptsächlich über die Leber verstoffwechselt (Heinz et al. 1968; Chen und Whistler 1977). Nach der Aufnahme gelangt Fruktose in den Dünndarm und von dort über spezifische Glut5-Transporter in die Darmzellen (Chen und Whistler 1977). Aus den Darmzellen wird die Verbindung über Glut2-Transporter resorbiert und über die Blutgefäße zur Leber (75 %) und zur Niere (15 %) transportiert. Im nächsten Schritt erfolgt der Fruktosemetabolismus durch eine Phosphorylierung von Fruktose zu Fruktose-1-Phosphat über Fruktokinase der Leber (D-Fruktose-1-Phosphotransferase, EC 2.7.1.3) (Heinz et al. 1968; Chen und Whistler 1977). Anschließend wird Fruktose-1-Phosphat von der Aldolase-1-B (EC 4.1.2.13) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd (GA) gespalten (Heinz et al. 1968; Chen und Whistler 1977). DHAP kann direkt über mehrere Schritte zu Pyruvat umgesetzt werden. GA wird unter ATP Verbrauch durch die Glycerinaldehyd-Kinase erneut phosphoryliert und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P) letztlich ebenfalls zu DHAP umgewandelt (Heinz et al. 1968; Chen und Whistler 1977).

Vermutlich kann 5-KF ebenfalls über die Zellen des Dünndarms in die Blutbahn gelangen und auf diesem Weg an die verschiedenen Organe verteilt werden. Es konnte belegt werden, dass 5-KF von der Fruktokinase der Leber als Substrat genutzt und unter ATP-Verbrauch zu 5-KF-1-Phosphat umgesetzt werden kann (Englard et al. 1972; Avigad und Englard 1975). Das Produkt kann nach der Phosphorylierung zwar an die Aldolase-1-B binden, eine Spaltung der Verbindung fand jedoch nachweislich nicht statt (Englard et al. 1972). Eine andere Studie zeigte, dass 5-KF-1-Phosphat durch Phosphokinasen der Muskulatur (D-Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase, EC 2.7.1.11) unter ATP Verbrauch ein weiteres Mal phosphoryliert werden kann (Avigad und Englard 1975). Das Produkt 5-KF-Diphosphat wird jedoch erneut nicht durch Aldolasen gespalten und

ebenfalls nicht weiter verwertet (Avigad und England 1975). Nach dem bisherigem Forschungsstand könnte 5-KF daher als kalorienfreie Substanz eingestuft werden (England et al. 1972; Avigad und England 1975; Wyrobnik und Wyrobnik 2009; Wyrobnik et al. 2013), jedoch bedarf diese Aussage weiterer Untersuchungen.

Bei der Bestimmung des kalorischen Wertes muss zusätzlich zur Verwertbarkeit durch den menschlichen Metabolismus auch die Fähigkeit zum Abbau von 5-KF durch die Darmmikrobiota bewertet werden. Durch die Bildung kurzkettiger Fettsäuren, wie Propionat, Acetat oder Butyrat, die anschließend vom Menschen verwertet werden können (Scheppach 1994), würde 5-KF folglich einen geringen kalorischen Wert aufweisen. Nach dem bisherigen Forschungsstand kann 5-KF von 15 der am häufigsten vorkommenden Bakterien der Darmmikrobiota nicht verstoffwechselt und zu kurzkettigen Fettsäuren umgesetzt werden (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.). Diese Beobachtung schließt unter anderem die Bakterienarten *Bacteroides vulgatus*, *Prevotella copri* und *Ruminococcus gnavus* ein, die als dominierende Spezies der drei diskreten Enterotypen der Darmmikrobiota angesehen werden (Arumugam et al. 2011). Weitere relevante Darmorganismen, darunter *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium leptum*, *Bifidobacterium (B.) adolescentis*, *Parabacteroides johnsonii*, *E. coli* K12 und *Lactobacillus reuteri*, zeigten ebenfalls kein Wachstum mit 5-KF als Substrat (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.). Eine Reduktion der Verbindung konnte in allen Fällen zusätzlich mittels HPLC ausgeschlossen werden (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.), weshalb 5-KF bisher als kalorienfrei eingestuft werden könnte. In diesem Fall würde 5-KF eine Besonderheit innerhalb der natürlich vorkommenden Süßungsmittel darstellen. Die vorliegenden Daten zur Verwertbarkeit des alternativen Süßungsmittels durch die Darmmikrobiota lassen weitere wichtige Rückschlüsse zu potentiellen Nebenwirkungen oder gesundheitlichen Risiken zu. Da 5-KF nach bisherigem Forschungsstand nicht als Wachstumssubstrat einer bestimmten Organismengruppe innerhalb der Darmmikrobiota genutzt werden kann, führt dies dort vermutlich nicht zu Wachstumsvorteilen von spezifischen Bakterienarten. Schwankungen des mikrobiellen Gleichgewichtes, welche die Verdauung und das allgemeine Wohlbefinden beeinträchtigen können (Suez et al. 2014), sind daher durch den Verzehr von 5-KF bisher auszuschließen.

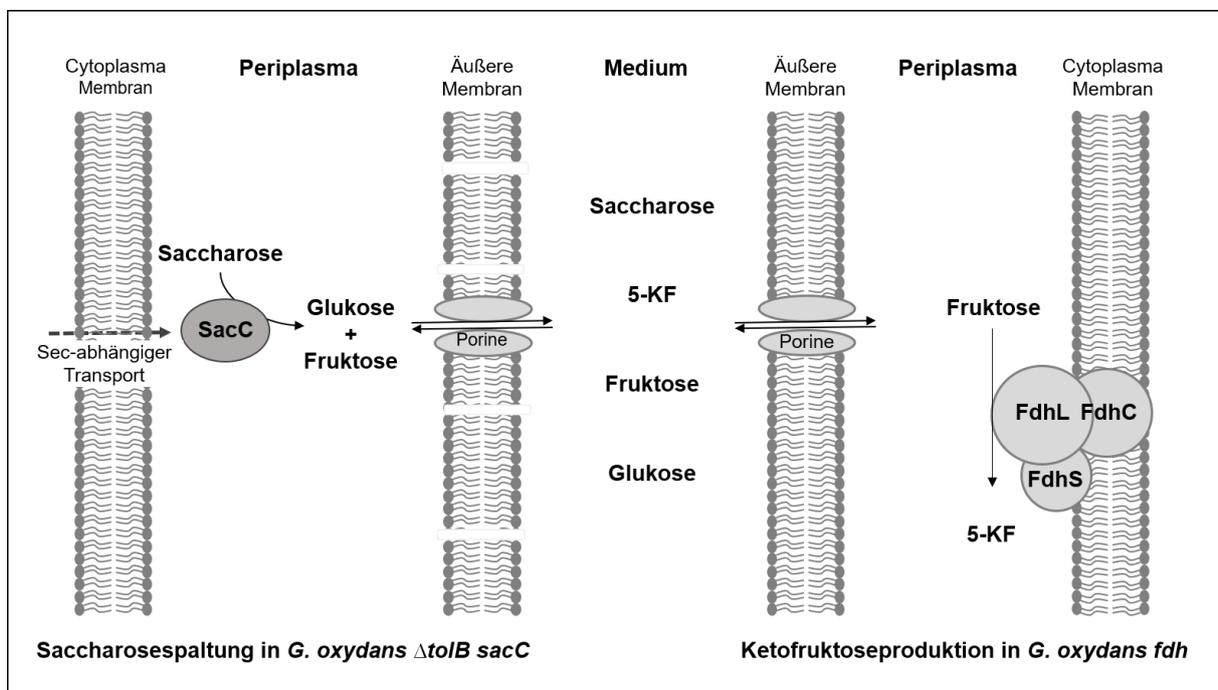
#### **4.2 Stand der 5-KF-Produktion zu Beginn dieser Arbeit**

Die Verbindung 5-KF wurde erstmals in den 60er Jahren in Kultivierungen von *G. cerinus* in Fruktose-haltigem Medium und als Nebenprodukt bei der Kojisäure-Fermentation aus Sorbose mittels *Acetobacter*-Spezies nachgewiesen (Weidenhagen und Bernsee 1960; Terada et al. 1961). Wenige Jahre später wurde die Synthese des alternativen Süßstoffs in weiteren Organismen entdeckt, darunter *G. thailandicus* (früher *G. suboxydans*) und *Pseudomonas convexa* (Sato et al. 1969; Longley und Perlman 1972) sowie *G. cerinus* und *G. japonicus* NBRC3260 (England und Avigad 1965; Yamada et al. 1966; Ameyama et al. 1981). Als Schlüsselenzym der 5-KF-Produktion aus Fruktose konnte eine membrangebundene Fruktose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.11, FDH) identifiziert werden (England und Avigad 1965). Das Enzym setzt sich aus drei Untereinheiten

zusammen, von denen FdhL und FdhS im Periplasma lokalisiert sind (Ameyama et al. 1981) (vgl. Kapitel 1.3, Abb. 1). FdhL besitzt N-terminal den Cofaktor FAD und stellt das aktive Zentrum des Enzyms dar (Ameyama et al. 1981). Die Verankerung von FdhS und FdhL mit der cytoplasmatischen Membran erfolgt über eine C-terminale Helix der Untereinheit FdhC (Ameyama et al. 1981). FdhC (Cytochrom *c*) weist außerdem drei Häm *c*-Bindemotive auf (Ameyama et al. 1981). Durch den Aufbau der membranständigen Dehydrogenase kann Fruktose direkt im Periplasma des Organismus am aktiven Zentrum FdhL zu 5-KF oxidiert werden (vgl. Kapitel 1.3, Abb. 1). Bei dieser Reaktion wird FAD zu FADH<sub>2</sub> reduziert. FADH<sub>2</sub> wird anschließend regeneriert. Die freigesetzten Elektronen werden erst an Häm *c* der FdhC-Untereinheit abgegeben (Bollella et al. 2018) und dann über den Ubichinonpool der Membran direkt in die Atmungskette eingespeist (Deppenmeier und Ehrenreich 2009). Sauerstoff stellt dabei den finalen Elektronenakzeptor dar (vgl. Kapitel 1.3, Abb. 1). Da die Fruktose-Dehydrogenasen der Stämme *G. cerinus* und *G. japonicus* NBRC3260 durch eine hohe Substratspezifität und Sensitivität gegenüber Fruktose charakterisiert werden konnten, wurde die FDH hauptsächlich als Biosensor zur Detektion von Fruktose in Lebensmitteln eingesetzt (Ameyama et al. 1981; Ikeda et al. 1990; Matsumoto et al. 1986; Murata et al. 2009; Trivedi et al. 2009). Die Produktion und Anwendung von 5-KF als Produkt des Enzyms blieb hingegen weitgehend unbeachtet, weshalb bis vor einigen Jahren nur wenige Verfahren zur Produktion der Verbindung entwickelt wurden (Huwig et al. 1994; Heinen et al. 1997; Schneider et al. 2012; Kawai et al. 2013) (vgl. Kapitel 1.3). Zur Synthese des alternativen Süßstoffs wurde daher in einer früheren Studie der Stamm *G. oxydans fdh* generiert, der die Oxidation von Fruktose durch eine Plasmid-vermittelte heterologe Produktion der FDH ermöglichte (Siemen et al. 2018). Aus dem Substrat Fruktose war mit diesem Stamm der erste, biotechnologische Produktionsprozess im industriellen Maßstab möglich, mit dem Ausbeuten von bis zu 0,98 g 5-KF/g Fruktose erzielt werden konnten (Herweg et al. 2018).

Zur Erweiterung des Produktionsprozesses auf das alternative Substrat Saccharose, wurde ein Zwei-Stamm-System entwickelt (Siemen et al. 2018), das auf der Co-Kultivierung der Stämme *G. oxydans fdh* und *G. oxydans ΔtolB sacC* basierte (Abb. 62). Um die Zusammensetzung dieses Systems zu erklären, muss zuerst die Aufnahme und der Metabolismus von Saccharose in *G. oxydans* betrachtet werden. Der Wildtyp-Stamm ist natürlicherweise aufgrund fehlender Gene nicht befähigt, das Disaccharid zu hydrolysieren (Prust et al. 2005; Kosciow 2017; Siemen et al. 2018). Zudem fehlen spezifische Transporter zur aktiven Aufnahme von Saccharose in die Zelle (Prust et al. 2005), weshalb eine Metabolisierung der Verbindung ausgeschlossen werden kann. Mono- und Disaccharide können aufgrund ihres Molekulargewichtes jedoch über Porine der äußeren Membran ins Periplasma gelangen, was für Saccharose in verschiedenen Studien bestätigt wurde (Kosciow 2017; Siemen et al. 2018). Um eine Saccharosespaltung als initialen Schritt der 5-KF-Produktion im Zwei-Stamm-System zu gewährleisten, wurde *G. oxydans ΔtolB sacC* (Kosciow 2017) verwendet. Dieser Stamm war Plasmid-vermittelt zur heterologen Produktion der Sucrase SacC aus *Z. mobilis* befähigt, wodurch Saccharose im Periplasma zu Fruktose und Glukose gespalten wurde (Abb. 62). Der Transport des Enzyms aus dem Cytoplasma erfolgte Sec-

abhängig durch eine eingefügte Signalsequenz der Pektatlyase B (PelB) aus *P. carotovora*. Eine Besonderheit des eingesetzten Stammes war die Deletion des Gens *gox1687*, das für das Protein TolB kodierte (Kosciow et al. 2016). Da TolB an der Integrität und Stabilität der äußeren Membran beteiligt ist (Lazzaroni et al. 1999), resultierte die Deletion von *gox1687* in einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Membran (Kosciow et al. 2016). Zudem lag eine gesteigerte Sekretion von SacC ins Periplasma und den extrazellulären Raum vor (Siemen et al. 2018). Für die Synthese von 5-KF wurde *G. oxydans fdh* in das Zwei-Stamm-System integriert, wodurch Fruktose im Periplasma dieses Stammes an der heterolog produzierten membrangebundenen FDH zu 5-KF oxidiert werden konnte (Abb. 62). Die aus der Saccharosespaltung resultierende Glukose diente beiden Stämmen zur Energiekonservierung und zur Bildung von Biomasse. Als Produkte des Glukosemetabolismus beider Stämme wurden außerdem 2- und 5-Ketoglukonat sowie Acetat identifiziert (Siemen et al. 2018).



**Abbildung 62:** Schematische Darstellung der Saccharosespaltung und 5-KF-Produktion im Zwei-Stamm-System. *G. oxydans ΔtolB sacC* produziert heterolog die extrazelluläre Sucrase SacC, wodurch eine periplasmatische Saccharosespaltung ermöglicht wird. Fruktose kann anschließend über Porine der äußeren Membran ins Periplasma von *G. oxydans fdh* gelangen und dort über die heterolog produzierte FDH direkt membranständig zu 5-KF oxidiert werden. Glukose dient beiden Stämmen zur Energiekonservierung und Produktion von Biomasse. Die Produkte können anschließend im Medium akkumulieren. Die Bildung von 2- und 5-Ketoglukonat sowie Acetat ist nicht dargestellt.

Obwohl durch das Zwei-Stamm-System in einigen Kultivierungen hohe Produktausbeuten erzielt wurden, konnten Schwachstellen in der Co-Kultivierung identifiziert werden. Die einzelnen Stämme wiesen häufig ein unterschiedliches Wachstumsverhalten auf, was zu geringen Aktivitäten der Schlüsselenzyme FDH oder SacC führen konnte. Dies wiederum resultierte in einer reduzierten Substratumsetzung und beeinflusste damit die Stabilität und Effizienz des Produktionsprozesses negativ. Der Einsatz der TolB-Deletionsmutante könnte diese Wachstumsunterschiede zudem

begünstigen, da Stämme mit verringerter Membranintegrität häufig eine erhöhte Sensitivität gegenüber toxischen Verbindungen wie Antibiotika aufweisen (Llamas et al. 2000; Cascales et al. 2002). Eine Verwendung von Kanamycin im Produktionsprozess war mit dem Zwei-Stamm-System jedoch erforderlich. Die größte Schwachstelle des Systems stellte die Saccharosespaltung durch das rekombinante Enzym SacC als initialen Schritt der 5-KF-Produktion dar. Unter Verwendung der eingefügten Signalsequenz von PelB lag die heterolog in *G. oxydans*  $\Delta tolB$  *sacC* produzierte Sucrase im Periplasma nur mit geringen Aktivitäten vor, weshalb keine ausreichend effiziente Hydrolyse des Substrats erfolgte. Dies wirkte sich entsprechend negativ auf die 5-KF-Produktion aus. Das Zwei-Stamm-System war daher für den industriellen Einsatz noch nicht optimal angepasst, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Optimierungen und Weiterentwicklungen zur Etablierung eines Ein-Stamm-Systems für die 5-KF-Synthese aus Saccharose durchgeführt wurden.

#### **4.3 Saccharose als alternatives Substrat für die 5-KF-Produktion**

Der Einsatz von Saccharose als Substrat für die Produktion von 5-KF bringt mehrere positive Aspekte mit sich. Zum einen würde die Verwendung des alternativen Substrats eine Reduktion der Kosten ermöglichen. Das Disaccharid Saccharose bietet gegenüber Fruktose in kristalliner Form keinen großen preislichen Vorteil. Die handelsüblichen Kosten für 1 kg hochreine Saccharose liegen bei etwa 15 Euro, der Kilopreis von Fruktose bei ca. 18 Euro (Preise der Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Stand im November 2020). Als Substrat kann jedoch auch Haushaltszucker verwendet werden, welcher etwa 99 % Saccharose enthält. Der Kilopreis dafür liegt bei ca. 72 Cent, wodurch die Produktionskosten erheblich reduziert werden können. Ein weiterer Aspekt für die Etablierung eines industriellen Produktionsprozesses aus Saccharose, ist die Möglichkeit des direkten Einsatzes von nachwachsenden Rohstoffen. Homogenisierte Zuckerrüben bestehen zu 75 % ihres Trockengewichts aus Saccharose (Wyse 1979), weshalb der Einsatz des Dünnsaftes direkt ohne weitere Verarbeitungsschritte, wie Aufkonzentrierung, Kristallisation und Raffination (vgl. Kapitel 4.3.1) denkbar wäre. Die Möglichkeit zur Produktion von 5-KF aus homogenisierten Zuckerrüben als Ausgangssubstrat konnte bereits in ersten Versuchsansätzen mit dem Zwei-Stamm-System belegt werden (Siemen et al. 2018). Dafür wurden Zuckerrüben gewaschen, zerschnitten und in Wasser aufgekocht, um die Saccharose zu extrahieren (Siemen et al. 2018). Unlösliches, pflanzliches Material wurde durch einen Filtrationsschritt von dem Rohsaft entfernt und der Extrakt anschließend autoklaviert, um Kontaminationen zu verhindern (Siemen et al. 2018). Eine weitere Aufarbeitung des Saftes musste nicht erfolgen. Die Prozessoptimierung im Zuge dieser Arbeit zur Etablierung eines industriell nutzbaren Ein-Stamm-Systems könnte daher zukünftig den Einsatz von Zuckerrüben und den dabei anfallenden Nebenprodukten, wie beispielsweise Melasse, erlauben. Die Erweiterung des 5-KF-Produktionsprozesses auf pflanzliche Materialien und der daraus resultierende Nachhaltigkeitsaspekt sind aus industrieller und bioökonomischer Sicht von großem Interesse.

#### **4.3.1 Industrielle Herstellung von Saccharose als Ausgangsstoff für die 5-KF-Synthese**

Saccharose kann als Hauptspeicherstoff aus vielen pflanzlichen Rohstoffen, vor allem Zuckerrohr (*Saccharum* spp.) und Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) im industriellen Maßstab gewonnen werden (Hatch und Slack 1966; Giaquinta 1979; Zhu et al. 1997; Ho et al. 2007). Die reife Zuckerrübe weist beim Erntezeitpunkt einen Saccharosegehalt zwischen 17 - 25 % auf (Wyse 1979; Doney et al. 1981), was bezogen auf den Trockenmasseanteil 70 - 75 % ausmacht (Wyse 1979; Doney et al. 1981; Campbell 2002; Panella 2010). Die industrielle Gewinnung des Disaccharids aus den genannten Rohstoffen verläuft über mehrere Schritte (Reinefeld und Thielecke 1984; Campbell 2002; Vaccari et al. 2005; Rajaeifar et al. 2019). Um den Rohsaft herzustellen müssen die Zuckerrüben zuerst zerkleinert (Rübenschnitzel) und der Zucker (ca. 13 % Saccharose, 1-2 % Raffinose sowie geringe Mengen Fruktose und Glukose) mit heißem Wasser aus den Zellen gewonnen werden (Gegenstromextraktion). Die extrahierten Rübenschnitzel werden anschließend aus dem Prozess separiert und als Futtermittel verwendet (Rajaeifar et al. 2019). Der Rohsaft wird für den weiteren Prozess genutzt und im nachfolgenden Schritt von Nicht-Zuckerstoffen, wie Pektin, organischen Säuren, Aminosäuren, Vitaminen, Betain und verschiedenen Salzen durch Kalk getrennt (Campbell 2002; Vaccari et al. 2005; Sims et al. 2010; Rajaeifar et al. 2019). Durch die anschließende Zugabe von Kohlendioxid wird Kalk als Carbonat ausgefällt und der pH-Wert des entstandenen Dünnsaftes eingestellt (Sims et al. 2010; Rajaeifar et al. 2019). Nach einem Filtrationsschritt, in dem auch das ausgefällte Carbonat abgetrennt wird, erfolgt eine Aufkonzentrierung des Saftes bei niedriger Temperatur und starkem Unterdruck (Campbell 2002; Vaccari et al. 2005; Sims et al. 2010; Rajaeifar et al. 2019). Der entstandene Dicksaft weist dann einen Zuckeranteil von 70 % auf (Vaccari et al. 2005). Als nächstes wird dem Dicksaft weiter Wasser entzogen, bis die gewünschte Zuckerkonzentration vorliegt (Vaccari et al. 2005). Es folgt ein Kristallisationsprozess mit anschließendem Zentrifugationsschritt, bei dem die Zuckerkristalle von der flüssigen Melasse getrennt werden (Vaccari et al. 2005; Rajaeifar et al. 2019). Die Zuckerkristalle besitzen am Ende des Prozesses eine hohe Reinheit und müssen nach der Separierung nur noch getrocknet und verpackt werden (Rajaeifar et al. 2019). Die Melasse beinhaltet noch Zuckerreste, darunter Saccharose und Raffinose, ist jedoch in der Herstellung kristalliner Saccharose aufgrund der hohen Viskosität und einem hohen Nicht-Zuckeranteil nicht verwendbar und daher ein separates Nebenprodukt der Zuckergewinnung (Rajaeifar et al. 2019). Melasse geht jedoch nicht verloren und kann beispielsweise in der pharmazeutischen Industrie oder als Tierfutter eingesetzt werden (Rajaeifar et al. 2019).

#### **4.3.2 Gewinnung von Fruktose und Nachteile der Verwendung des Monosaccharids als Substrat für die 5-KF-Produktion**

Die industrielle Herstellung von Fruktose erfolgt ebenfalls aus pflanzlichen Rohstoffen, wie beispielsweise aus der Saccharose-haltigen Zuckerrübe, aber auch aus Maisstärke oder Inulin (Hanover und White 1993; Vuilleumier 1993; Ricca et al. 2007; Lima et al. 2011; White 2014). Der Prozess zur Gewinnung von Fruktose aus der Zuckerrübe ist in den ersten Schritten identisch zu

Saccharose. Aus geschnittenen und zerkleinerten Rübenstücken wird im Extraktionsverfahren das Disaccharid aus den Zellen gewonnen und weiter zum Rohsaft verarbeitet. Dieser wird anschließend von Nicht-Zuckerstoffen durch Kalk gereinigt und filtriert. Bevor ein Aufkonzentrieren des Saftes erfolgen kann, sind jedoch für die Herstellung von Fruktose weitere Schritte erforderlich, welche die Verbindung zu einem kostspieligeren Substrat für die 5-KF-Produktion machen. Die im Rohsaft enthaltene Saccharose muss dafür erst enzymatisch in Glukose und Fruktose gespalten und die beiden Monosaccharide anschließend chromatographisch voneinander getrennt werden (Smith und Priestersbach 1954; Hanover und White 1993; Vuilleumier 1993; Lima et al. 2011). Anschließend erfolgt, wie auch bei der Produktion von Saccharose, erneut der Prozess der Kristallisation und Raffination. Die hauptsächliche Gewinnung von Fruktose erfolgt aus Mais, wobei das Korn einen Stärkeanteil von 60 % seines Gesamtgewichts aufweist (Hanover und White 1993; Lima et al. 2011; White 2014). Bei diesem Prozess erfolgt zuerst eine Extraktion des Polysaccharids aus dem Maiskorn. Zur Freilegung des Stärkekörpers erfolgt eine Behandlung mit SO<sub>2</sub>, wodurch die Kornhülle erweicht und die Proteinmatrix denaturiert wird (Hanover und White 1993; Lima et al. 2011). Anschließend werden Keim-, Faser- und Glutenfraktionen in einem sechsstufigen Prozess zerkleinert und entfernt, bis reine Stärke übrigbleibt (Lima et al. 2011). Als nächstes erfolgt die Spaltung der Stärke in die Glukoseteile durch saure oder enzymatische Hydrolyse am Polymerrückgrat (Lima et al. 2011). Danach werden Verunreinigungen und Nicht-Zuckerstoffe chromatographisch und durch Filtration entfernt. Anschließend erfolgt der Einsatz einer Glukose-Isomerase zur Umwandlung von Glukose in Fruktose. Das entstandene Produkt wird erneut gereinigt und die Fruktoseeinheiten von der verbleibenden Glukose chromatographisch getrennt (Hanover und White 1993; Lima et al. 2011; White 2014). Als nächstes folgt der Prozess der Kristallisation und Raffination, der auch bei der Produktion von Saccharose anfällt (Hanover und White 1993; Vuilleumier 1993; White 2014). Unabhängig von dem eingesetzten Rohstoff aus dem Fruktose industriell gewonnen wird, erfordern beide Prozesse zusätzliche Verarbeitungsschritte im Vergleich zur Herstellung von Saccharose, was entsprechend zeitaufwändiger und mit höheren Kosten verbunden ist.

#### **4.4 Einsatz von *Gluconobacter*-Stämmen zur Synthese von 5-KF**

Die Wahl des Expressionsstammes für einen industriell geeigneten Produktionsprozess des alternativen Süßstoffs spielte eine wichtige Rolle. Angelehnt an die Ergebnisse bisheriger Studien (Siemen et al. 2018, Herweg et al. 2018; Adachi et al. 2020; Battling et al. 2020), sollte das Ein-Stamm-System auf der Basis eines *Gluconobacter*-Stammes etabliert werden. Ein besonderes Merkmal dieser Gattung ist die metabolische Fähigkeit zur unvollständigen, schnellen Oxidation von Zuckern, Alkoholen und Polyolen durch membrangebundene Dehydrogenasen im Periplasma (De Ley et al. 1984; Deppenmeier et al. 2002; De Muyck et al. 2007; Mientus et al. 2017). Die resultierenden Produkte, wie Aldehyde, Ketone und organische Säuren, können anschließend über Porine der äußeren Membran in den Kulturüberstand diffundieren und dort akkumulieren. Diese Eigenschaften sind für einen 5-KF-Produktionsstamm von großer Bedeutung, da die

membrangebundene FDH zu den genannten Enzymklassen gehört und die unvollständige Oxidation von Fruktose zu 5-KF katalysiert (Ameyama et al. 1981; Kawai et al. 2013). Durch die Akkumulierung des Süßstoffs im Kulturüberstand wird zudem eine kostengünstige und einfache Produktgewinnung ermöglicht, was den Einsatz eines *Gluconobacter*-Stammes weiter begünstigt (De Ley et al. 1984; Gupta et al. 2001; De Muynck et al. 2007). *Gluconobacter*-Arten sind aufgrund ihrer natürlichen Habitate, wie Blüten, Nektar und Früchte, optimal an hohe Zuckerkonzentrationen angepasst (Battey und Schaffner 2001; Gupta et al. 2001; Gullo et al. 2006) und eignen sich dadurch besonders für die Produktion eines alternativen Süßstoffs. Stämme dieser Gattung, wie beispielsweise *G. oxydans*, finden außerdem bereits zahlreiche Einsätze in der Industrie zur Herstellung verschiedenster Produkte (Deppenmeier et al. 2002). Dazu zählen unter anderem L-Sorbose als Vorstufe von Vitamin C, 6-Amino-L-Sorbose zur Synthese des Antidiabetikums Miglitol, Glukonsäure sowie die Feinchemikalien 2- und 5-Ketoglukonat (Reichstein und Grüssner 1934; Olijve und Kok 1979; Schedel 2000; De Muynck et al. 2007; Hancock 2009). Auch zur Herstellung von geschmacksgebenden Zusätzen (Rabenhorst et al. 2001) und zur Produktion von Erfrischungsgetränken, wie Bionade® oder Kombucha wird *G. oxydans* bereits verwendet.

#### **4.5 Auswirkungen verschiedener Signalpeptide auf die hydrolytische Aktivität von SacC im Periplasma von *G. oxydans***

Die erste Voraussetzung, die für die Entwicklung eines Ein-Stamm-Systems zur Produktion von 5-KF aus dem Substrat Saccharose erfüllt werden musste, war die Gewährleistung einer schnellen und verlässlichen Saccharosespaltung. Das Vorliegen von Fruktoseeinheiten war essentiell für eine effiziente 5-KF-Synthese und abhängig von der hydrolytischen Aktivität des verwendeten Saccharose-spaltenden Enzyms. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erläutert, stellte die Saccharosespaltung durch die Sucrase SacC jedoch den limitierenden Schritt des bisherigen Zwei-Stamm-Systems dar (vgl. Kapitel 4.2). Während SacC im Ursprungsorganismus *Z. mobilis* für das Substrat Saccharose einen  $V_{max}$ -Wert von 1800 U/mg Protein erzielte (O'Mullan et al. 1992), lag die Aktivität des heterolog in *G. oxydans*  $\Delta toIB$  *sacC* produzierten Enzyms lediglich bei  $11 \pm 1$  mU/mg Protein. Diese Unterschiede in der hydrolytischen Aktivität könnten auf die Konstruktion des Stammes *G. oxydans*  $\Delta toIB$  *sacC* zurückzuführen sein. Für SacC konnte im Wirtsorganismus kein bekanntes Signalpeptid identifiziert werden, weshalb die Sekretion dort vermutlich über einen bisher ungeklärten Transportweg erfolgte (Preziosi et al. 1990; O'Mullan et al. 1992). Um eine periplasmatische Lokalisation des Enzyms im Zwei-Stamm-System zu gewährleisten, wurde die Signalsequenz von PelB eingefügt (Kosciow 2017) (vgl. Kapitel 4.2). Die Verwendung dieser Sequenz lag in der Vielzahl bereits erfolgreich in *Gluconobacter* sekretierter Proteine begründet (Choi und Lee 2004; Mergulhao et al. 2005; Zeiser et al. 2014; Kosciow et al. 2016). Möglicherweise lag im Fall von SacC jedoch eine Inkompatibilität zwischen dem eingefügten Signalpeptid und dem Protein vor, was zu einer unzureichenden Translokation über die Cytoplasmamembran geführt haben könnte. Um ein Nichterkennen der Sequenzen durch den

Organismus als weitere Fehlerquelle auszuschließen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit ein Austausch der Signalsequenz von PelB durch nativ in *G. oxydans* vorkommende Signalpeptide.

Allgemein stellt das Einbringen eines Signalpeptides zum Transport eines Proteins aus dem Cytoplasma eine bekannte und häufig verwendete Methode dar (Gierasch 1989; von Heijne 1990; Rapoport 1992; Brockmeier et al. 2006; Hemmerich et al. 2016; Kosciow et al. 2016). In Bakterien werden hauptsächlich zwei Wege genutzt, um Proteine über die Cytoplasmamembran zu sekretieren. Der Großteil periplasmatischer Proteine wird Sec-abhängig exportiert, wobei die Polypeptide im ungefalteten Zustand unter ATP-Verbrauch durch die Membran geführt werden (Schatz und Beckwith 1990; Fekkes und Driessen 1999; Driessen und Nouwen 2008; du Plessis et al. 2011). Die Tat-abhängige Sekretion aus dem Cytoplasma erfolgt hingegen im (teil-) gefalteten Zustand (Berks 1996; Berks et al. 2002; Lee et al. 2006; Hou und Brüser 2011; Nuñez et al. 2012). In beiden Fällen müssen die Proteine N-terminal ein Signalpeptid tragen, welches charakteristisch für den jeweiligen Transportweg ist. Die Strukturen der Signalsequenzen sind sehr variabel, weisen jedoch drei generelle Bereiche auf (von Heijne 1990), deren Primärstruktur die Exporteffizienz des Proteins beeinflusst (Vlasuk et al. 1983; Emr und Silhavy 1983; von Heijne 1990). Identifiziert werden konnten eine positiv geladene N-Region, eine zentrale hydrophobe H-Region und eine polare C-Region (von Heijne 1990). Die N-Region spielt eine entscheidende Rolle bei der Translokation, die auf dem Vorhandensein von positiv geladenen Aminosäureresten basiert (von Heijne 1990). Fehlen diese basischen Aminosäuren oder sind durch saure ersetzt, kann das zu einer geringeren Exportgeschwindigkeit des Proteins führen (Vlasuk et al. 1983; Lehnhardt et al. 1988; Bosch et al. 1989; Puziss et al. 1989). Auch die hohe Anzahl hydrophober Aminosäuren der H-Region ist für den Proteintransport essentiell. Die Effizienz der Translokation kann sogar mit steigender Hydrophobizität und Länge des H-Bereichs optimiert werden, wohingegen geladene Aminosäuren einen negativen Effekt haben (Chou und Kendall 1990). Die polare C-Region ist an der Interaktion mit der Signalpeptidase beteiligt, die zur Abspaltung des Signalpeptids nach dem Transport führt (von Heijne 1984; Dalbey und von Heijne 1992). Typischerweise ist der N-terminale Bereich einer Tat-Signalsequenz im Vergleich zu einem Sec-Signalpeptid deutlich verlängert (Berks 1996; Natale et al. 2008). Zudem weist dieser Bereich zwei aufeinanderfolgenden Argininreste (R) auf, wovon sich der Name „twin arginin translocation“ (Tat) ableitet (Chaddock et al. 1995; Berks et al. 2002).

Aus einer *Gluconobacter*-spezifischen Signalpeptid-Bibliothek (Kosciow et al. 2014) wurden in dieser Arbeit die Sec-Transport-vermittelnden Signalsequenzen der Proteine Gox2219 (Ribose-ABC-Transporterbindeprotein), Gox0605 ( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase), Gox0748 (Aldose-1-Epimerase) und Gox0854 (Sorbitol-Dehydrogenase) sowie das Tat-Transport-vermittelnde Signalpeptid von Gox0187 (putative Disulfidisomerase) ausgewählt. Diese waren durch einen möglichst polaren N-Bereich und eine hydrophobe H-Region charakterisiert (Kosciow et al. 2014), was einen positiven Effekt auf die Translokationseffizienz haben sollte (Vlasuk et al. 1983; Lehnhardt et al. 1988; Bosch et al. 1989; Puziss et al. 1989; Chou und Kendall 1990). Durch den

Austausch der bisher verwendeten Signalsequenz von PelB mit den genannten *Gluconobacter*-spezifischen Signalpeptiden konnte die Saccharosespaltung maximal um 8 % erhöht werden (vgl. Kapitel 3.1.1), was für einen industriellen Produktionsprozess weiterhin nicht ausreichte. Es fiel auf, dass weder das jeweilige Signalpeptid, noch die Art des Transportweges zu einer signifikanten Erhöhung der hydrolytischen Aktivität von SacC führte. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass ein grundsätzliches Transportproblem von SacC über die Cytoplasmamembran vorlag. Auch die Wahl des *Gluconobacter*-Stammes hatte nur marginale Auswirkungen auf die Transporteffizienz und damit die periplasmatische Saccharosespaltung durch die Sucrase. Die TolB-Mutante zeigte allgemein geringfügig bessere hydrolytische Effizienzen (vgl. Kapitel 3.1.1, Abb. 4 und 5), die in der Deletion von *tolB*, welches für das häufig auftretenden Protein TolB im Periplasma von gram-negativen Bakterien kodiert (Imperi et al. 2009; Kosciow 2017), begründet lagen. Da TolB entsprechend nicht ins Periplasma transloziert werden musste, könnte dies zu einer geringeren Auslastung des Sec-abhängigen Transportmechanismus geführt haben (Kosciow 2017).

#### **4.5.1 Signalpeptid-vermittelter Proteintransport in *G. oxydans***

Der Einsatz von Signalsequenzen zum Transport von Proteinen über den Sec-vermittelten Weg in *G. oxydans* ist grundsätzlich möglich und konnte in verschiedenen Arbeiten bereits angewendet werden (Zeiser et al. 2014; Kosciow et al. 2014; Kosciow et al. 2016). Die Sec-Maschinerie setzt sich aus einem membraneingebetteten Proteinkomplex, bestehend aus SecY, SecE und SecG sowie der ATPase SecA zusammen (Brundage et al. 1990; Driessen und Nouwen 2008; Natale et al. 2008; du Plessis et al. 2011). In Gram-negativen Bakterien ist häufig noch das Chaperon SecB involviert, dass die Faltung des zu transportierenden Proteins vor dem Export verhindert (Driessen 2001; Driessen und Nouwen 2008). Die membranintegralen Proteine SecD und SecF sind mit SecYEG assoziiert und fördern die Translokation des Präproteins (Duong und Wickner 1997). Diese sind jedoch für die Sekretion nicht essentiell (du Plessis et al. 2011). Der Transport ungefalteter Proteine zum Sec-Apparat in der Membran erfolgt entweder posttranslational oder kotranslational (Natale et al. 2008; du Plessis et al. 2011). Der posttranslationale Weg wird durch die Bindung des Präproteins an das Chaperon SecB vermittelt (Fekkes und Driessen 1999; Driessen 2001; Bechtluft et al. 2007). Der Protein-Chaperon-Komplex wird anschließend zum Sec-Apparat geleitet, wo SecB an die ATPase SecA bindet. Nach dem Transfer des Präproteins an SecA löst sich SecB ab und die Translokation durch den SecYEG-Membrankanal wird unter ATP-Verbrauch durch SecA vermittelt (Schatz und Beckwith 1990; Natale et al. 2008; du Plessis et al. 2011). Für den kotranslationalen Weg bindet ein Signalprotein SRP (signal recognition particle) an das Signalpeptid des Präproteins (Natale et al. 2008; du Plessis et al. 2011), wodurch der Transport zum SRP-Rezeptor FtsY an der Membran vermittelt wird (Luirink et al. 1994; Ng et al. 1996). Nach Interaktion von FtsY mit dem SRP-gekoppelten Präprotein wird dieser Komplex an den Sec-Apparat geleitet und das Präprotein an SecA übertragen. Im Anschluss an die Translokation wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase vom Protein abgespalten oder verbleibt als

Membrananker an membrangebundenen Proteinen (von Heijne 1990; Dalbey und von Heijne 1992; Driessen 2001; Natale et al. 2008; du Plessis et al. 2011).

Durch bioinformatische Analysen des sequenzierten Genoms (Prust et al. 2005) konnten Gene für alle Proteine der Sec-Maschinerie in *G. oxydans* 621H identifiziert werden. Dazu zählen *gox1678*, das für die ATPase SecA kodiert sowie *gox0360*, *gox1306* und *gox2283* für den Proteinkomplex SecYEG. Das Chaperon SecB wird in *G. oxydans* durch die Gene *gox1885* und *gox2237* vermittelt sowie SecDF durch *gox2402* und *gox2401*. Zudem konnten auch das SRP-Protein Gox0197 und der zugehörige Rezeptor Gox1451 im Genom des Stammes detektiert werden. Gene, die für die Signalpeptidase I und II kodieren, wurden ebenfalls identifiziert (*gox0871* und *gox1250*). Somit sind alle notwendigen Proteine für den post- und kotranslationalen Weg zum Sec-Apparat sowie den Transport durch die Cytoplasmamembran in *G. oxydans* vorhanden. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass das Ausbleiben einer verbesserten Saccharosespaltung durch SacC auf fehlende Bestandteile oder einen nicht funktionellen Sec-Apparat zurückzuführen ist.

Der Tat-vermittelte Transport von SacC wurde in dieser Arbeit durch das Einbringen des Signalpeptids von Gox0187 analysiert, resultierte jedoch ebenfalls nicht in einer Verbesserung der periplasmatischen Saccharosespaltung. Bei dieser Art der Sekretion werden gefaltete Proteine mit prosthetischen Gruppen oder Cofaktoren über die Cytoplasmamembran transportiert (Berks 1996; Berks et al. 2002; Lee et al. 2006; Hou und Brüser 2011; Nuñez et al. 2012). Für Proteine ohne Cofaktoren, die sich zu schnell nach der Translation falten, ist eine Sekretion über diesen Transportweg ebenfalls beschrieben (Berks 1996; Berks et al. 2002; Berks et al. 2005), weshalb der Tat-vermittelte Proteinexport für SacC nicht ausgeschlossen ist. Eine detaillierte Beschreibung des generellen Transportmechanismus sowie der Tat-Maschinerie befindet sich in Kapitel 4.6.3. An dieser Stelle kann jedoch vorweggenommen werden, dass alle notwendigen Untereinheiten des Tat-Translokationsapparats nach bioinformatischer Analyse in *G. oxydans* 621H vorhanden sind. Von einer Funktionalität dieses Transportweges kann daher ausgegangen werden, weshalb das Ausbleiben einer optimierten Saccharosespaltung durch SacC nicht auf eine fehlerhafte Tat-Transportmaschinerie zurückgeführt werden kann.

#### **4.5.2 Mögliche Gründe für eine unzureichende Translokationen von SacC im Rahmen dieser Arbeit**

Generell führt der Einsatz von Signalpeptiden nachweislich nicht immer zu einem erfolgreichen Proteintransport (Moreno et al. 1980; Smith et al. 1985; Rosenberg 1998; Baneyx 1999; Mergulhao und Monteiro 2004). Da es keine allgemein gültige Signalsequenz gibt, die eine sichere und effiziente Translokation für jedes Protein und jeden Organismus erlaubt (Choi und Lee 2004; Sletta et al. 2007; Heggeset et al. 2013), kann es häufig zu Inkompatibilitäten zwischen dem eingefügten Signalpeptid und dem Protein kommen. Die Effektivität der jeweiligen Signalsequenz muss daher für jedes Protein experimentell überprüft werden (Heggeset et al. 2013). Studien zur Entwicklung eines allgemein gültigen Signalpeptids belegen, dass die Exporteffizienz in jedem Fall stark

abhängig von dem jeweiligen Transportprotein ist und für jedes Protein deutliche Unterschiede in der Effizienz vorliegen (Sletta et al. 2007). Es ist daher durchaus denkbar, dass eine Inkompatibilität von SacC mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Signalsequenzen vorlag.

Neben dieser Vermutung können weitere Faktoren die Transporteffizienz verringern und in dieser Arbeit eine Rolle gespielt haben. Beispielsweise sind unvollständige Translokationen über die innere Membran bekannt (Moreno et al. 1980; Baneyx 1999) und können für SacC nicht ausgeschlossen werden. In vielen Fällen liegt aber auch eine unzureichende Kapazität der Exportmaschinerie vor (Rosenberg 1998; Mergulhao und Monteiro 2004). Für den Sec-vermittelten Proteintransport findet außerdem häufig eine zu schnelle Proteinfaltung im Cytoplasma vor, was auf eine limitierende Chaperonanzahl zurückzuführen ist (Lee und Olins 1992; Perezperez et al. 1995; Baneyx 1999). In jedem Fall resultiert ein verminderter Transport in einer Akkumulation des rekombinanten Proteins im Cytoplasma in einer unbrauchbaren Form (Rosenberg 1998). Dies erfolgt vor allem bei heterologen Proteinproduktionen unter Verwendung eines starken Promotors (Mergulhao und Monteiro 2004; Terpe 2006) und kann durch Zugabe von bakteriellen Chaperonen oder einer langsamen Genexpression optimiert werden (Lee und Olins 1992; Blight et al. 1994; Perezperez et al. 1995; Rosenberg 1998). Sollte die Translationsrate von SacC durch den Einsatz des starken p264-Promotors (Kallnik et al. 2010) die Translokationsrate deutlich übersteigen, wäre die Akkumulation der ungefalteten oder bereits gefalteten Proteine im Cytoplasma ein denkbarer Grund für die in dieser Arbeit detektierte geringe Saccharosespaltung.

Weitere Gründe für eine unzureichende Translokation kann der proteolytischer Abbau ungefalteter Proteine im Cytoplasma oder die Ausbildung von Einschlusskörpern darstellen (Georgiou und Valax 1996; Hannig und Makrides 1998; Sørensen und Mortensen 2005; Terpe 2006). Beide Mechanismen treten beispielsweise bei heterologen Proteinproduktionen in *E. coli* häufig auf (Van der Berg et al. 1999). Der Abbau fehlgefalteter Proteine in *E. coli* findet ATP-abhängig unter anderem durch die Lon- und ClpXP-Protease statt (Baneyx und Mujacic 2004). Auch *G. oxydans* besitzt homologe Proteine dieser Art. Ein zur Lon-Protease homologes Protein wird durch das Gen *gox0085* kodiert sowie homologe Enzyme zu ClpX und ClpP durch die Gene *gox0086* und *gox0087* (Prust et al. 2005; Siemen 2017). Ein Abbau des fehlgefalteten oder zu früh gefalteten SacC, das in Folge einer Signalpeptid-hervorgerufenen verringerten Translokationseffizienz im Cytoplasma akkumuliert, könnte für das Ausbleiben einer optimierten Saccharosespaltung verantwortlich sein.

Eine Verbesserung der periplasmatischen Saccharosespaltung durch SacC konnte in dieser Arbeit letztlich ohne zusätzlich eingefügte Signalsequenz erzielt werden (vgl. Kapitel 3.1.1.3). Da ein Signalpeptidaustausch nachweislich nicht zur gewünschten Steigerung der hydrolytischen Aktivität von SacC führte (vgl. Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2) und *G. oxydans* keine Systeme für die Aufnahme von Saccharose in die Zelle besitzt (Prust et al. 2005), deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen Signalpeptid-unabhängigen Transport des Enzyms über die Cytoplasmamembran hin. Da für SacC im Wirtsorganismus *Z. mobilis* kein bekanntes Signalpeptid identifiziert werden konnte, erfolgte der Export des Enzyms in diesem Stamm vermutlich ebenfalls über einen bisher

unbekannten Transportweg (Preziosi et al. 1990; O'Mullan et al. 1992; Senthilkumar et al. 2004). Eine solche Art der Sekretion konnte auch für Typ I-Levansucrasen in *Gluconobacter*-Stämmen beobachtet werden, die ohne bekanntes Signalpeptid in den extrazellulären Raum exportiert wurden (Jakob et al. 2019). Der Signalpeptid-unabhängige Transport dieser Enzyme in Essigsäurebakterien oder anderen Proteobakterien ist allerdings bisher noch nicht analysiert (Jakob et al. 2019). Allgemein gibt es jedoch in Gram-negativen Bakterien verschiedene Transportsysteme, die eine Sekretion von Proteinen über die Cytoplasmamembran und die äußere Membran unabhängig von Sec- bzw. Tat-spezifischen Signalsequenzen ermöglichen (Büttner und Bonas 2002; Saier 2006; Pukatzki et al. 2007). Dazu gehören unter anderem Typ I Sekretionssysteme, bei denen Proteine, Ionen und Metabolite bis zu einem Molekulargewicht von 800 kDa unter ATP-Verbrauch aus dem Cytoplasma in den extrazellulären Raum exportiert werden können (Wandersman 1992; Binet et al. 1997; Hueck 1998; Holland et al. 2005). Am Beispiel von *E. coli* setzt sich der Sekretions-Apparat aus einem ABC-Transporter HlyB (ATPase), einem Membran-Fusionsprotein HlyD und einem äußeren Membranfaktor (outer membrane factor, OMF), dem Protein TolC zusammen (Wandersman und Delepelaire 1990, Binet et al. 1997; Holland et al. 2005). Nach derzeitigem Forschungsstand sind Typ I Sekretionssysteme in *G. oxydans* entweder nicht vorhanden oder unvollständig und daher nicht funktionell (Prust et al. 2005). Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte belegt werden, dass homologe Proteine der Untereinheiten TolC und HlyD, kodiert durch *gox2487* und *gox0714*, im Genom von *G. oxydans* vorhanden sind (Kosciow et al. 2016). Jedoch fehlen Gene, die für HlyB-ähnliche Proteine kodieren. Da es sich bei diesem Protein um die essentielle ATPase handelt (Holland et al. 2005), kann der Transport von SacC über diesen Weg in *G. oxydans* vermutlich ausgeschlossen werden. Das Typ III Sekretionssystem gram-negativer Bakterien stellt einen weiteren Sec- und Tat-unabhängigen Transportweg dar (Nguyen et al. 2000), durch den Proteinen direkt ins extrazelluläre Medium oder in das Cytoplasma der Zielzelle übertragen werden können (Hueck 1998; Galán und Collmer 1999; Lee und Schneewind 1999). Aufgrund fehlender Struktureinheiten kann diese Art der Sekretion für SacC in *G. oxydans* jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden. Weitere bekannte Systeme, darunter Typ II, IV und V, nutzen zur Überwindung der cytoplasmatischen Membran den Sec-abhängigen Proteintransport (Pugsley et al. 1997; Henderson et al. 1998; Hueck 1998; Russel 1998; Cao und Saier 2003; Filloux 2004) und sind daher im Zuge dieser Fragestellung nicht relevant.

#### **4.6 Optimierung der Saccharosespaltung durch die Invertase1417**

##### **4.6.1 Saccharose-spaltende Enzyme innerhalb der Gattung *Gluconobacter***

Die Identifizierung geeigneter Enzyme zur Hydrolyse von Saccharose innerhalb der Gattung *Gluconobacter* erfolgte angelehnt an bekannte Strategien in Bakterien. Enzyme, für die eine hydrolytische Aktivität für das Substrat Saccharose beschrieben wurde, sind beispielsweise Sucrasen, wie Levan- und Inulosucrasen sowie Invertasen und Levanasen (Kunst et al. 1977, Martin et al. 1987, Preziosi et al. 1990, O'Mullan et al. 1992, Menéndez et al. 2002). Extrazelluläre

Levan- oder Inulosucrasen können einerseits Saccharose hydrolysieren, gleichzeitig aber durch eine Transfruktosylierungsreaktion die resultierende Fruktose auf einen Fruktosylrest übertragen (Dedonder 1966; Lyness und Doelle 1983; Olivares-Illana et al. 2003; Ozimek et al. 2006). Enzyme dieser Klassen waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht relevant, da eine rein hydrolytische Aktivität des Enzyms gewünscht war, um alle Fruktoseeinheiten für die Produktion von 5-KF nutzen zu können. Invertasen, bzw.  $\beta$ -Fruktosidasen, katalysieren die Spaltung von Saccharose in die Monosaccharide Glukose und Fruktose (Gascón et al. 1968; Liebl et al. 1998; Nadeem et al. 2015; Lincoln und More 2017). Diese Enzyme können entweder dem  $\beta$ -Fruktosidase-Typ angehören oder zählen zu den  $\alpha$ -Glukosidasen. Sowohl Invertase als auch  $\alpha$ -Glukosidasen hydrolysieren Saccharose, unterscheiden sich aber in ihrer Wirkungsweise. Während  $\beta$ -Fruktosidasen Saccharose am Fruktose-Ende hydrolysieren, erfolgt die Spaltung durch  $\alpha$ -Glukosidasen am Glukose-Ende (Kulp 1975; Kotwal und Shankar 2009). Gelegentlich, aber nicht unter allen Bedingungen, sind auch  $\beta$ -Fruktosidasen zu einer Transfruktosylierungsreaktion befähigt (Antosova und Polakovic 2001). Diese Funktion musste für ein potentiell geeignetes Enzym im Rahmen dieser Arbeit experimentell ausgeschlossen werden. Neben Invertasen wäre auch der Einsatz von Levanasen denkbar. Diese Enzymklasse ist durch eine hydrolytische, Fruktose- oder Levanbiose-freisetzende Funktion charakterisiert, welche nachweislich zur Spaltung von Saccharose eingesetzt werden kann (Kunst et al. 1977, Blatch und Woods 1993, Wanker et al. 1995, Li et al. 1997, Menéndez et al. 2002).

Durch bioinformatische Analysen des Genoms von *G. oxydans* 621H konnte eine Levansucrase, kodiert durch das Gen *gox0873* sowie ein als Levanase annotiertes Enzym, Gox1010, gefunden werden. Kultivierungsansätze in Saccharose-haltigem Medium belegen jedoch, dass eine Spaltung des Substrats durch *G. oxydans* nicht erfolgen kann (vgl. Kapitel 3.1.2 sowie 3.2.5). Ein Wachstum dieses Stammes mit 50 mM Saccharose als einziger C-Quelle wurde in einer weiteren Arbeit ebenfalls nicht beobachtet (Kosciow 2017). Letztlich konnte in den Stämmen *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* LMG 26773 ein Saccharose-spaltendes Enzym (Inv1417) identifiziert und der Gruppe der Invertasen zugeordnet werden (vgl. Kapitel 3.1.2 und 3.2.3). Das Enzym zeigte deutlich höhere hydrolytische Effizienzen als SacC (vgl. Kapitel 3.2.4 und Abb. 17) und ermöglichte daher eine Optimierung der Saccharosespaltung im künftigen Produktionsprozess.

#### **4.6.2 Charakterisierung von Inv1417**

Die kinetischen Parameter von Inv1417, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, unterstreichen das Potential des Enzyms zur extrazellulären Saccharosespaltung. Für das Substrat Saccharose wies Inv1417 bei einer Temperatur von 60 °C und einem pH-Wert von 5 eine spezifische Aktivität von  $3285 \pm 179$  U/mg Protein auf (vgl. Kapitel 3.2.4, Abb. 15). Bei einer an den 5-KF-Produktionsprozess angepassten Temperatur von 30 °C konnte für Inv1417 ein  $V_{\max}$  von  $2295 \pm 243$  U/mg Protein bestimmt werden, was nach derzeitigem Forschungsstand die höchste Aktivität aller Invertasen unter mesophilen Bedingungen darstellt (Placzek et al. 2016). Invertasen der Stämme *Z. mobilis* und *B. infantis*, für die im mesophilen Temperaturbereich hohe hydrolytische

Aktivitäten ermittelt wurden, wiesen im Vergleich ein  $V_{\max}$  von 1800 U/mg Protein bzw. 850 U/mg Protein auf (O'Mullan et al. 1992; Warchol et al. 2002).

#### 4.6.3 Tat-vermittelter Transport von Inv1417 und Nachweis der Proteinlokalisierung

Eine notwendige Voraussetzung für den Einsatz der Invertase 1417 als Saccharose-spaltendes Enzym im Zuge des 5-KF-Produktionsprozesses, war die Gewährleistung einer periplasmatischen Lokalisation. Da *G. oxydans* aufgrund fehlender Transportsysteme nicht zur Aufnahme von Saccharose in die Zelle befähigt ist (Prust et al. 2005), diese aber über Porine der äußeren Membran ins Periplasma diffundieren kann (Kosciow 2017; Siemen et al. 2018) (vgl. Kapitel 4.2), war eine Sekretion von Inv1417 über die Cytoplasmamembran für die 5-KF-Synthese unumgänglich.

Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte für die Invertase ein Tat-Signalpeptid identifiziert werden (vgl. Kapitel 3.2.1, Abb. 11). Der Tat-Transportmechanismus setzt sich aus einem heterotrimeren Komplex der Proteine TatA, TatB und TatC zusammen (Sargent et al. 1998; Sargent et al. 1999; Natale et al. 2008) und ist innerhalb der  $\alpha$ -Proteobakterien, zu denen die Gattung *Gluconobacter* gehört, hoch konserviert (Nuñez et al. 2012). Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte das Vorhandensein der Gene *gox1241 (tatA)*, *gox1757 (tatB)* und *gox1758 (tatC)* in *G. oxydans* bestätigt werden, weshalb ein Tat-Signalpeptid vermittelter Transport von Inv1417 grundsätzlich erfolgen kann. Allgemein ermöglicht der Tat-Transportweg die Sekretion von (teil-) gefalteten Proteinen mit prosthetischen Gruppen oder Cofaktoren über die Cytoplasmamembran (Berks 1996; Berks et al. 2002; Lee et al. 2006; Hou und Brüser 2011; Nuñez et al. 2012). Die Faltung des jeweiligen Proteins im Cytoplasma ist ein essentieller Schritt dieses Transportwegs und erfolgt häufig mit Hilfe von Chaperonen (Brüser und Sanders 2003; Natale et al. 2008). Anschließend wird das Signalpeptid des (teil-) gefalteten Proteins von TatC erkannt und bindet darüber an den Membrankomplex TatBC (de Leeuw et al. 2002; Mori und Cline 2002, Alami et al. 2003; Brüser und Sanders 2003; Berks et al. 2005). Im nächsten Schritt findet eine Assemblierung des TatBC-Proteinkomplexes mit TatA statt (de Leeuw et al. 2002; Mori und Cline 2002; Alami et al. 2003; Brüser und Sanders 2003), wodurch die Translokation eingeleitet wird. Nach Abspalten des Signalpeptides (mit Ausnahme von Membranproteinen) löst sich TatA wieder aus dem TatBC-Komplex, wodurch ein neuer Transport beginnen kann (Mori und Cline, 2002).

Da die Invertase1417 keinen Cofaktor und keine prosthetische Gruppe besaß, war es notwendig, die Funktionalität der Tat-vermittelten Sekretion im Zuge dieser Arbeit zu bestätigen. Dieser Transportweg ist grundsätzlich auch für Proteine ohne Cofaktor, die sich zu schnell nach der Translation falten, möglich (Berks 1996; Berks et al. 2002; Dilks et al. 2003; Berks et al. 2005) und konnte häufig bei hydrolytischen Enzymen beobachtet werden (Berks et al. 2005). Durch eine Zellfraktionierung des Stammes *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  wurde die Translokalisierung der heterolog produzierten Invertase schließlich überprüft und eine Sekretion des Proteins über die Cytoplasmamembran bestätigt (vgl. Kapitel 3.4.6.1). Insgesamt konnten zwar nur 40,6 % der

hydrolytischen Aktivität von Inv1417 im Periplasma von *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* gefunden werden, während die verbleibenden 59,4 % in der cytoplasmatischen Fraktion bestimmt wurden (vgl. Kapitel 3.4.6.1). Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität des Enzyms reichte eine Transporteffizienz von 40,6 % für eine effiziente Hydrolyse des Disaccharids jedoch nachweislich aus (vgl. Kapitel 3.4.6.2).

#### **4.6.4 Potential von Inv1417 zur Erweiterung der 5-KF-Produktion auf alternative Substrate**

Die Verwendung von Inv1417 im Zuge des 5-KF-Produktionsprozesses erlaubte neben der Synthese ausgehend von Saccharose auch eine Erweiterung des Verfahrens auf andere Fruktosehaltige Verbindungen, wie aus dem Substratspektrum des Enzyms ermittelt werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.3, Abb. 13). Die hydrolytische Aktivität von Inv1417 ermöglichte unter anderem den Einsatz von Raffinose als Ausgangssubstrat. Das Trisaccharid ( $\alpha$ -D-Galactopyranosyl-1-6- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-2- $\beta$ -D-fructofuranosid) konnte durch die heterolog produzierte Invertase in Fruktose und Melibiose (D-Galaktose- $\alpha$ -1,6-D-Glukose) gespalten werden. Raffinose ist natürlicherweise beispielsweise in Zuckerrüben enthalten und wird bei der industriellen Zuckerherstellung größtenteils in Form von Melasse als Nebenprodukt verarbeitet (vgl. Kapitel 4.3.1). Es wäre durch das Substratspektrum von Inv1417 daher möglich, bei der Synthese von 5-KF ausgehend von homogenisierten Zuckerrüben, wie in Kapitel 4.3 thematisiert, nicht nur die Saccharoseeinheiten der Zuckerrübe zu nutzen, sondern ebenfalls die enthaltene Raffinose. Dadurch wäre es möglich, die 5-KF-Ausbeute weiter zu steigern. Zusätzlich könnte Melibiose als zweites Produkt der Raffinosespaltung unverstoffwechselt im Kulturüberstand akkumulieren und daraus gewonnen werden. Aufgrund der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten hat Melibiose eine hohe industrielle Relevanz. Dazu zählt beispielsweise die Anwendung zur Abschwächung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer (Lee et al. 2015; Lin et al. 2016). Melibiose werden zudem präbiotische Effekte zugeschrieben (Adamberg et al. 2018), weshalb auch die Lebensmittelindustrie ein großes Interesse an dieser Verbindung hat. So kann der Verzehr von Melibiose und Melibiose-haltigen Verbindungen die Ansiedlung und Prävalenz von Arten der Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus*, die mit einer gesunden Darmflora in Verbindung gebracht werden (Roberfroid 2001; Moure et al. 2006; Chapla et al. 2012), begünstigen (Côté et al. 2003; Tzortzis et al. 2004; Adamberg et al. 2018; İspirli et al. 2020). Bei Präbiotika handelt es sich um Verbindungen, die selektiv von Organismen der humanen Darmmikrobiota genutzt werden und dadurch gesundheitliche Vorteile mit sich bringen (Roberfroid 2001; Gibson et al. 2017; Adamberg et al. 2018). Wie auch Melibiose, sind diese präbiotischen Substrate vom menschlichen Metabolismus nicht verstoffwechselbar und können stattdessen von einigen Darmbakterien zum Wachstum und zur Produktion von kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) genutzt werden (Roberfroid 2001; Topping und Clifton 2001; Flint et al. 2015). Häufig werden die SCFA Acetat, Propionat und Butyrat gebildet, denen eine positive Auswirkung auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben wird (Gibson et al. 2017). Durch die selektive Verwertbarkeit der Präbiotika kann außerdem das Wachstum bestimmter Darmorganismen gefördert und deren Prävalenz erhöht werden. Da die

Zusammensetzung der Darmmikrobiota in direkter Korrelation zur menschlichen Gesundheit steht (Blaut und Clavel 2007; Cryan und Dinan 2012; Sommer und Bäckhed 2013; Wu et al. 2015; Woting und Blaut 2016; Franke und Deppenmeier 2018) sind Verbindungen mit präbiotischer Wirkung, wie Melibiose, von hoher Relevanz. Durch eine regelmäßige Einnahme konnten neben dem positiven Einfluss auf den Magen-Darm-Trakt auch positive Effekte auf den Kardiometabolismus, das Knochengüst und das Nervensystem beobachtet werden (Saad et al. 2013; Gibson et al. 2017).

Weitere Substrate von Inv1417 waren die Fruktooligosaccharide 1-Kestose sowie Levantriose und Levanbiose (vgl. Kapitel 3.2.3, Abb. 13). Die Hydrolyse des Trisaccharids 1-Kestose ( $\beta$ -D-Fruktofuranosyl-2-1- $\beta$ -D-Fruktofuranosyl-2-1- $\alpha$ -D-Glucopyranosid) führte entsprechend zur Freisetzung von einem Molekül Fruktose sowie Saccharose, die dann erneut gespalten werden könnte. Die Verbindung ist sehr kostspielig und daher in reiner Form, trotz der zwei potentiell verfügbaren Fruktoseeinheiten, kein geeignetes Substrat für die Produktion von 5-KF. 1-Kestose kann jedoch in geringen Mengen als Nebenprodukt der Raffination von Zuckerrüben aus Melasse anfallen (Abe et al. 2012; Shiomi et al. 2016) und wäre bei der Synthese von 5-KF ausgehend von homogenisierten Zuckerrüben ebenfalls nutzbar (vgl. Kapitel 4.3). Levantriose und Levanbiose sind aus  $\beta$ -2-6-glykosidisch verknüpften Fruktanen aufgebaut. Bei der Hydrolyse dieser Verbindungen entstehen aus Levanbiose zwei Fruktoseeinheiten sowie im Fall von Levantriose Fruktose und zusätzlich Levanbiose, die anschließend erneut endständig gespalten werden kann. Hierbei handelt es sich ebenfalls um teure Substrate, die daher keine geeigneten Rohstoffe für die Synthese von 5-KF darstellen. Interessanterweise lag mit Levan kein Substrat von Inv1417 vor (vgl. Kapitel 3.2.3), obwohl die Verbindung ebenfalls durch eine  $\beta$ -2-6-Verknüpfung der Fruktosyleinheiten aufgebaut ist (Antosova und Polakovic 2001; Öner et al. 2016; Hövels et al. 2020). Eine Hydrolyse des Polyfruktans Inulin, bestehend aus  $\beta$ -2-1-verknüpften Fruktanen (Antosova und Polakovic 2001; Kelly 2008) konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Weitere Fruktose-haltige Verbindungen, darunter Melezitose, Turanose, Maltulose, Lactulose, Palatinose stellten ebenfalls keine nutzbaren Substrate von Inv1417 dar. Allgemein weisen Invertasen häufig ein großes Substratspektrum auf und beschränken sich nur in Ausnahmefällen auf eine Verbindung (Liebl et al. 1998), was mit den Ergebnissen von Inv1417 übereinstimmt. Vergleichbar zu Inv1417 weist das Enzym aus *Arthrobacter* sp. K-1 ebenfalls hydrolytische Aktivitäten für Raffinose, 1-Kestose und Levanbiose auf, nicht aber für Palatinose und Maltulose (Fujita et al. 1990a). Einige  $\beta$ -Fruktofuranosidasen der Gattung *Bifidobacterium* können 1-Kestose und Saccharose ebenfalls als Substrat nutzen, sind im Gegenteil aber zusätzlich zur Hydrolyse von Inulin befähigt (Muramatsu et al. 1994; Warchol et al. 2002; Janer et al. 2004; Omori et al. 2010). Für das Polyfruktan Levan konnte für die Enzyme aus Bifidobakterien hingegen ebenfalls keine Fruktosefreisetzung beschrieben werden (Muramatsu et al. 1994; Warchol et al. 2002; Janer et al. 2004; Omori et al. 2010). Auch die Invertase aus *Thermotoga maritima* zeigt ein individuelles Substratspektrum. Das Enzym weist vergleichbar zu Inv1417 hydrolytische Aktivitäten für Saccharose und Raffinose auf, jedoch zusätzlich auch für Inulin (Liebl et al. 1998).

Wie bereits in Kapitel 4.6.1 erwähnt, weisen  $\beta$ -Fruktofuranosidasen gelegentlich neben einer hydrolytischen Aktivität auch eine Transfruktosylierungsreaktion auf (Antosova und Polakovic 2001). Dies kann vor allem unter hohen Saccharosekonzentrationen beobachtet werden und ermöglicht die Bildung von Fruktooligosacchariden, wie beispielsweise Neokestose, 1-Kestose oder Nystose (Gross et al. 1954; Fujita et al. 1990b; Yun 1996; Antosova und Polakovic 2001). Obwohl dies eine Synthese industriell relevanter, kostspieliger Verbindungen ermöglicht, war eine solche Funktion im Zuge des 5-KF-Produktionsprozesses mit Hinblick auf eine maximale Produktausbeute nicht gewünscht. Für Inv1417 konnte eine Transfruktosylierungsreaktion während der Bestimmung des Substratspektrums ausgeschlossen werden, da die Hydrolyse von Saccharose in diesen Analysen immer zur Freisetzung äquimolarer Fruktose- und Glukosekonzentrationen führte.

#### **4.7 Produktion des alternativen Süßstoffs 5-KF mit verschiedenen Ein-Stamm-Systemen**

Ein Hauptziel dieser Arbeit lag in der Generierung eines Ein-Stamm-Systems zur Produktion von 5-KF aus dem alternativen Substrat Saccharose. Auf Basis von verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen konnten drei potentielle Expressionssysteme entwickelt werden, von denen vor allem *G. oxydans* $\Delta$ *mgdh::fdh inv* für eine 5-KF-Produktion im industriellen Maßstab verwendet werden kann (Kapitel 3.4.6.2). Als Wildtyp-Produzent weist jedoch auch *G. japonicus* LMG 26773 verschiedene Eigenschaften auf, die einen Einsatz des Stammes im Lebensmittelsektor begünstigen. Der Prozess und die Vorteile der genannten Stämme werden nachfolgend diskutiert.

##### **4.7.1 Einsatzmöglichkeiten von *G. japonicus* LMG 26773 im Lebensmittelsektor**

*G. japonicus* LMG 26773 erfüllte bereits als Wildtyp-Stamm die beiden essentiellen Voraussetzungen für den Prozess der 5-KF-Produktion aus dem Substrat Saccharose. Durch eine Invertase (KXV40112.1) war der Stamm zu einer effizienten Spaltung des Disaccharids befähigt (vgl. Kapitel 3.1.2, Abb. 9). Bioinformatische Analysen belegten zudem das Vorhandensein des *fdh*-Operons im Genom, weshalb die aus der Hydrolyse resultierenden Fruktoseeinheiten bereits natürlicherweise zu 5-KF oxidiert werden konnten (vgl. Kapitel 3.4.3.1, Abb. 26). Aufgrund der geringen FDH-Aktivität von  $80 \pm 7$  mU/mg Gesamtzellprotein (vgl. Kapitel 3.4.2, Abb. 24) erzielten Produktionen mit *G. japonicus* LMG 26773 jedoch nur relativ geringe 5-KF-Ausbeuten von 40 % der verfügbaren Fruktoseeinheiten (vgl. Kapitel 3.4.3.1). Ein weiterer Grund für das Ausbleiben hoher Produktmengen stellte der Abbau von 5-KF in der stationären Wachstumsphase und damit während des Produktionsprozesses dar (vgl. Kapitel 3.4.3.1). Zudem konnte die Bildung des Nebenproduktes Levan detektiert werden, wodurch Fruktoseeinheiten für die Synthese von 5-KF verloren gingen. Als reiner 5-KF-Produktionsorganismus im industriellen Maßstab weist *G. japonicus* LMG 26773 daher noch einige Nachteile auf, der Wildtyp-Stamm qualifiziert sich jedoch aufgrund mehrerer Eigenschaften dennoch für den Einsatz im Lebensmittelsektor.

Die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen zur Produktion von Lebensmitteln in der Biotechnologie wird häufig von Konsumenten abgelehnt (Henriksen et al. 1999; von Wright und

Bruce 2003; Runge et al. 2017). Vor allem in Europa äußern sich viele Verbraucher skeptisch gegenüber potentieller Risiken auf die menschliche Gesundheit (Henriksen et al. 1999; von Wright und Bruce 2003; Runge et al. 2017). Durch den Einsatz von Antibiotika-Resistenzkassetten werden zudem negative Effekte auf die Umwelt befürchtet (Henriksen et al. 1999; von Wright und Bruce 2003; Runge et al. 2017). Anders steht es um die Akzeptanz gegenüber dem Einsatz von unveränderten Mikroorganismen in verschiedenen Bereichen des Lebensmittelsektors. Die Verwendung von Wildtyp-Stämmen, wie beispielsweise Milchsäurebakterien zur Herstellung von Käse oder Sauerkraut gelten allgemein als unkritisch (Nout 2001; von Wright und Bruce 2003). Auch weitere Prozesse, wie Fleischfermentationen durch *Staphylococcus carnosus* oder der Einsatz von Wildtyp-Stämmen zur Produktion von Aminosäuren oder Fettsäuren, sind seit Jahren etabliert (von Wright und Bruce 2003). Es wird deutlich, dass die Akzeptanz für unmodifizierte Organismen in Lebensmitteln wesentlich höher ist. Um kritische Konsumenten für den biotechnologisch hergestellten Süßstoff 5-KF zu gewinnen, ist der Einsatz des Wildtyp-Stammes *G. japonicus* LMG 26773 als Produktionsorganismus aus Sicht der Lebensmittelindustrie daher trotz der geringen Ausbeuten sehr interessant.

*G. japonicus* LMG 26773 ermöglicht außerdem neben der Produktion von 5-KF zusätzlich die Synthese von Levan, was einen weiteren positiven Aspekt für den Lebensmittelsektor darstellt. Durch die Verwendung des Stammes können damit einerseits die kalorienreiche Zucker Saccharose und Fruktose zu 5-KF umgewandelt werden, was eine Reduktion des kalorischen Nährwertes ermöglicht, während ein süßer Geschmack erhalten bleibt. Gleichzeitig kann durch das Nebenprodukt Levan ein präbiotischer Effekt erzielt werden. Das Polyfuktan wird im Zuge der Kultivierung von *G. japonicus* LMG 26773 in Saccharose-haltigem Medium durch die Levansucrase KXV40946.1 (EC 2.4.1.10) gebildet (vgl. Kapitel 3.4.3.1, Abb. 26). Das Enzym spaltet im ersten Schritt die  $\alpha$ -1- $\beta$ -2-glykosidische Bindung des Substrats Saccharose. Der daraus resultierende Fruktosylrest wird anschließend auf die nicht-reduzierende Fruktoseeinheit des nächsten Akzeptor-Moleküls Saccharose übertragen (Dedonder 1966; Lyness und Doelle 1983; Jakob et al. 2012; Öner et al. 2016). Das entstandene Produkt kann dann erneut als Akzeptor-Molekül für weitere Fruktosylreste dienen, wodurch schließlich ein Fuktan mit hohem Polymerisierungsgrad vorliegt (Chambert et al. 1974). Das Präbiotikum Levan ist vom Menschen nicht metabolisierbar und fördert nachweislich das Wachstum probiotischer Bakterien der Darmmikrobiota (Porrás-Domínguez et al. 2014; Adamberg et al. 2018). Zudem werden der Verbindung in mehreren Studien antioxidative, antibakterielle und antivirale Eigenschaften zugeschrieben (Liu et al. 2012; Byun et al. 2014, Esawy et al. 2011), weshalb Levan auch aus pharmazeutischer Sicht eine relevante Rolle einnimmt.

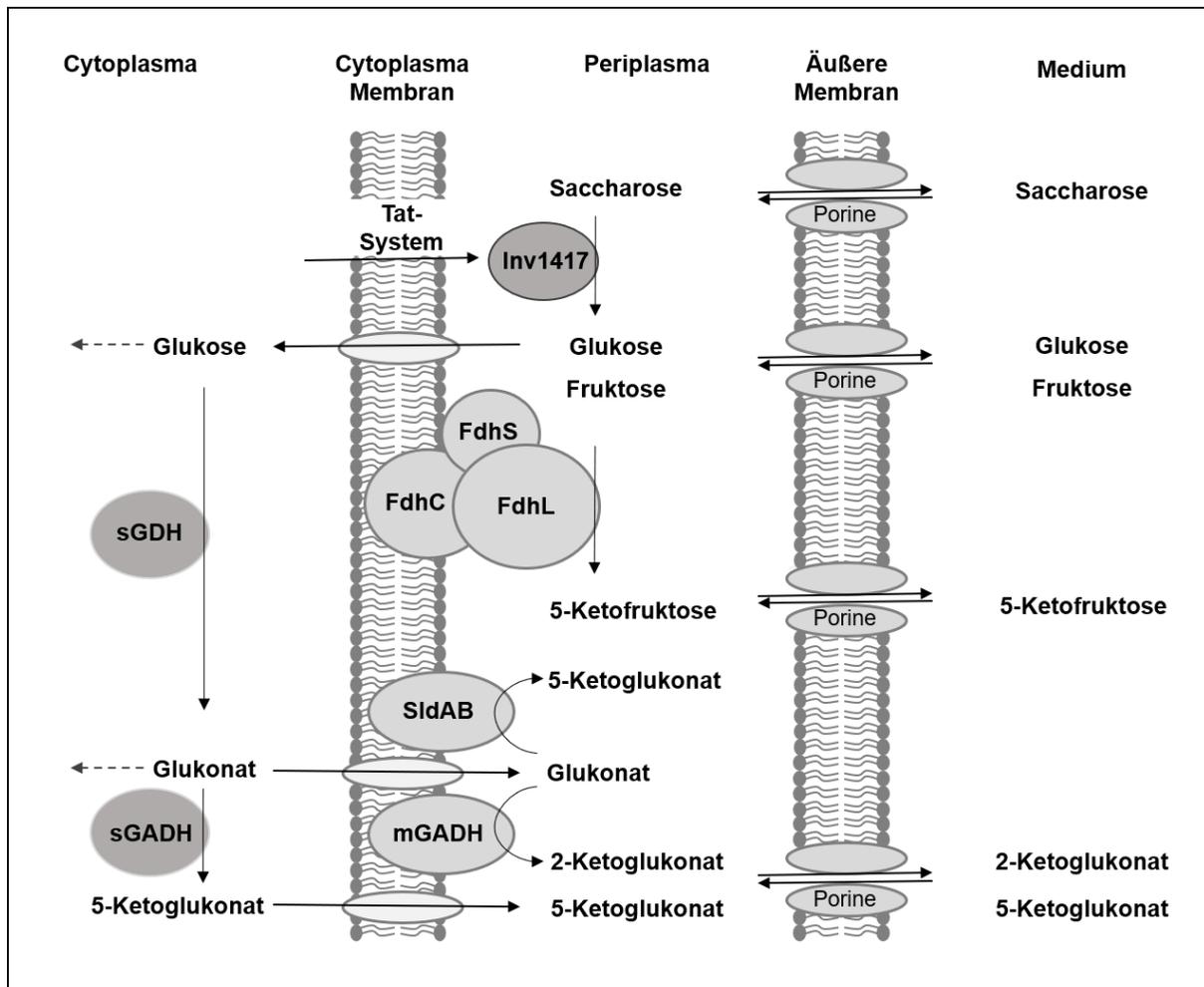
#### **4.7.2 *G. oxydans* $\Delta$ mgdh::fdh inv als Ein-Stamm-System zur Synthese von 5-KF aus Saccharose**

Mit *G. oxydans*  $\Delta$ mgdh::fdh inv konnte im Zuge dieser Arbeit ein weiteres Ein-Stamm-System generiert werden, dass eine Synthese von 5-KF mit Produktausbeuten von  $84 \pm 2$  % aus dem alternativen Substrat Saccharose ermöglichte (vgl. Kapitel 3.4.6.2). Dieses System basierte auf

dem Stamm *G. oxydans* 621H, der für einen effizienten Prozess mehrfach genetisch modifiziert wurde. Um die Synthese des alternativen Süßstoffs zu vermitteln, wurde das *fdhSCL*-Gencluster in das Genom des Stammes anstelle des Gens *gox0265* integriert (vgl. Kapitel 3.4.5.1). Als geeigneter Promotor wurde der starke, konstitutiv exprimierte p264-Promotor ausgewählt, der durch die 5' nicht-translatierten Bereiche des Gens *gox0264* kodiert wird (Kallnik et al. 2010). Die Deletion des Gens *gox0265* führte dazu, dass eine Produktion der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase (mGDH) nicht mehr möglich war, was in einer reduzierten Metabolisierung von Glukose resultierte (vgl. Kapitel 3.4.6.2 und 4.7.3). Um die Spaltung des Substrats zu ermöglichen, wurde der Stamm durch das Plasmids pBBR1p264-*inv1417* weiter modifiziert. Als Wildtyp-Stamm ist *G. oxydans* nicht zur Hydrolyse von Saccharose befähigt (vgl. Kapitel 3.2.5), weshalb eine Plasmid-vermittelte heterologe Produktion der Invertase1417 zur Generierung des Ein-Stamm-Systems essentiell war.

Der Prozess der 5-KF-Produktion mit *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* aus dem alternativen Substrat umfasste mehrere Schritte (Abb. 63). Saccharose gelangte aus dem Medium über Porine der äußeren Membran ins Periplasma des Stammes und konnte dort durch die heterolog produzierte Invertase1417 in Glukose und Fruktose gespalten werden (Abb. 63). Die periplasmatische Lokalisation des Enzyms wurde durch ein Tat-Signalpeptid vermittelt, welches N-terminal mit Hilfe bioinformatischer Analysen identifiziert werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.1). Die aus der Saccharosespaltung resultierenden Fruktoseeinheiten konnten direkt durch die membranständige FDH, die aufgrund des chromosomal integrierten *fdhSCL*-Genclusters heterolog produziert wurde, im Periplasma zu 5-KF oxidiert werden (Abb. 63). Der alternative Süßstoff akkumulierte anschließend im Medium, was eine einfache und effiziente Produktgewinnung ermöglicht. Die aus der Hydrolyse freigesetzten Glukoseeinheiten konnten in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* aufgrund der Deletion von *gox0265* nicht über die mGDH metabolisiert werden. Auf den regulären Glukosemetabolismus in *G. oxydans* wird im Detail im nachfolgenden Kapitel (4.7.3) eingegangen. Dennoch wurden während des Produktionsprozesses durch *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* geringe Mengen an 2- und 5-Ketoglukonat als Produkte des Glukosestoffwechsels gebildet (vgl. Kapitel 3.4.6.2). Dies war durch die lösliche Glukose-Dehydrogenase (sGDH), kodiert durch das Gen *gox2015* zu erklären. Glukose konnte während des Produktionsprozesses über spezifische Transporter in die Zelle aufgenommen und cytoplasmatisch an der sGDH zu Glukonat oxidiert werden (Abb. 63). Diese Verbindung wurde anschließend entweder cytoplasmatisch oder periplasmatisch zu 5-Ketoglukonat umgewandelt (Matsushita et al. 2003) (Abb. 63). Die Bildung von 2-Ketoglukonat aus Glukonat erfolgte membranständig im Periplasma von *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* (Klasen et al. 1995; Prust et al. 2005; Rauch et al. 2010; Peters et al. 2013) (Abb. 63). Eine detaillierte Beschreibung des cytoplasmatischen Glukosemetabolismus sowie der Produktion von 2- und 5-Ketoglukonat ist Kapitel 4.7.3 zu entnehmen. Eine weitere Möglichkeit der Glukoseverwertung in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* stellte die Phosphorylierung von Glukose oder Glukonat (Abb. 63, gestrichelte Pfeile) und die anschließende Metabolisierung über den Pentosephosphatweg dar (Deppenmeier und Ehrenreich 2009; Rauch et al. 2010; Richhardt

et al. 2013; Zahid und Deppenmeier 2016). Neben 2- und 5-Ketoglukonat konnte auch die Bildung von Acetat als Nebenprodukt des 5-KF-Produktionsprozesses in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* nachgewiesen werden. Diese Verbindung entstand bei der Degradierung von Glukose im Zuge des Pentosephosphatwegs und dem unteren Teil der Glykolyse aus Pyruvat (Krajewski et al. 2010; Rauch et al. 2010; Hanke et al. 2013; Peters et al. 2013).



**Abbildung 63:** Schematische Darstellung des Saccharose-Metabolismus in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv*. Die Abkürzungen werden im Folgenden erklärt: sGDH (lösliche Glukose-Dehydrogenase, Gox2015), sGADH (lösliche Glukonat 5-Dehydrogenase, Gox2187), mGADH (membrangebundene Glukonat-Dehydrogenase, Gox1230-1232), SldAB (Sorbitol-Dehydrogenase, Gox0854-0855), FdhSCL (Untereinheiten der membrangebundene Fruktose-Dehydrogenase), Inv147 (KXV26505.1 in *G. japonicus* LMG 1417). Das Tat-Signalpeptid-abhängige Transportsystem durch Gox1241 (TatA), Gox1757 (TatB) und Gox1758 (TatC) ist in der Abbildung als Tat-System bezeichnet. Porine der äußeren Membran sind als graue Ovale, spezifische Transporter in der Cytoplasmamembran als weiße Ovale abgebildet. Die gestrichelten Pfeile stellen die Phosphorylierung von Glukose (Gox1182) bzw. Glukonat (Gox1709) und die Degradierung von Glukose-6-Phosphat bzw. 6-Phosphoglukonat über den Pentosephosphatweg dar.

Durch die Integration des *fdhSCL*-Genclusters und die daraus resultierende Fähigkeit zur heterologen Produktion der FDH erhielt *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* außerdem einen metabolischen und energetischen Vorteil. Fruktose wird im Wildtyp-Stamm *G. oxydans* normalerweise hauptsächlich intrazellulär verstoffwechselt. Das Monosaccharid wird dafür ins Cytoplasma

aufgenommen und durch eine Fruktokinase (Gox0284) phosphoryliert (Richhardt et al. 2012) (vgl. Abb. 64). Anschließend kann Fruktose-6-Phosphat durch eine Glukose-6-Phosphat-Isomerase (Gox1704) zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt und in den oxidativen Pentosephosphatweg eingespeist werden (Richhardt et al. 2012) (vgl. Abb. 64). Diese Art der Energiekonservierung läuft wesentlich langsamer ab als die periplasmatische Oxidation durch membranständige Dehydrogenasen (Deppenmeier et al. 2002; Matsushita et al. 1994). Die membranständige FDH in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  erlaubte daher eine schnelle periplasmatische Fruktose-Oxidation und eine Übertragung der bei dieser Reaktion freigesetzten Elektronen über die Cytochrom c-Untereinheit FdhC in die Atmungskette (vgl. Kapitel 1.3, Abb. 1). Diese effiziente Energiegewinnung führte zu einem Wachstumsvorteil der Mutante gegenüber dem Wildtyp-Stamm. Siemen et al. (2018) bestätigten diese Beobachtung durch einen direkten Vergleich des Wachstums der FDH-Mutante *G. oxydans fdh* mit *G. oxydans* 621H unter Verwendung von Fruktose als Kohlenstoffquelle. Während *G. oxydans* 621H eine Wachstumsrate von  $0,11 \text{ h}^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 6,36 h erzielte, lag die Wachstumsrate von *G. oxydans fdh* bei  $0,19 \text{ h}^{-1}$  und die Verdopplungszeit verkürzte sich auf 3,64 h (Siemen et al. 2018).

#### 4.7.3 Glukosemetabolismus in *G. oxydans*

Um die Auswirkung der Deletion von *gox0265* in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  im Detail zu verstehen, ist eine Erläuterung der generellen Glukoseverwertung des Organismus notwendig. Grundsätzlich kann die Verstoffwechslung von Glukose in *G. oxydans* sowohl periplasmatisch als auch cytoplasmatisch erfolgen (Olijve und Kok 1979; Richhardt et al. 2013), wobei die periplasmatische Oxidation den bevorzugten Stoffwechselweg darstellt (Deppenmeier et al. 2002). Die Reaktion im Periplasma wird durch die membrangebundene Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängige Glukose-Dehydrogenase (mGDH) vermittelt, die durch das Gen *gox0265* kodiert ist (Matsushita et al. 1994). Bei dieser Reaktion wird Glukose zu  $\delta$ -Glukonolakton umgewandelt. Die Elektronen werden anschließend erst in den Ubichinonpool in der Cytoplasmamembran geleitet und dann über Chinol-Oxidasen an den finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen. Während dieses Transferprozesses werden Protonen über die Zellmembran gepumpt, wodurch der elektrochemische Protonengradient für die ATP-Synthese generiert wird (Kulhánek 1989, Ameyama et al. 1981). Diese Möglichkeit der Glukosemetabolisierung entfiel in der Mutante *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  aufgrund der Deletion des Gens *gox0265*.  $\delta$ -Glukonolakton kann im Zuge des generellen Glukosemetabolismus im Periplasma entweder chemisch oder enzymatisch durch eine Glukono- $\delta$ -Laktonase, zu Glukonat hydrolysiert werden (Fewster 1958; Olijve und Kok 1979; Matsushita et al. 1980; Buchert und Viikari 1988; Shinagawa et al. 2009). Im nächsten Schritt kann Glukonat periplasmatisch durch die membrangebundene Glukonat-Dehydrogenase (mGADH, Gox1230–1232) weiter zu 2-Ketoglukonat oder durch die membrangebundene Sorbitol-Dehydrogenase (SldAB, Gox0854-0855) zu 5-Ketoglukonat oxidiert werden (Klasen et al. 1995; Matsushita et al. 2003; Prust et al. 2005; Rauch et al. 2010; Peters et al. 2013) (vgl. Abb. 63).

Die cytoplasmatische Verstoffwechslung von Glukose ist ebenfalls auf verschiedenen Wegen möglich. Dafür muss Glukose in jedem Fall zuerst über spezifische Transporter in der Membran ins Cytoplasma aufgenommen werden (vgl. Kapitel 4.7.2, Abb. 63). Anschließend wird das Monosaccharid entweder durch die Glukokinase (Gox1182) phosphoryliert (vgl. Abb. 63, gestrichelter Pfeil) oder durch die lösliche NADP-abhängige Glukose-Dehydrogenase (sGDH, Gox2015) zu Glukonat oxidiert (Klasen et al. 1995, Rauch et al. 2010) (vgl. Abb. 63). Im nachfolgenden Schritt kann Glukonat von der löslichen NADP-abhängigen Glukonat 5-Dehydrogenase (sGADH, Gox2187) weiter zu 5-Ketoglukonat umgewandelt werden (vgl. Abb. 63). Als weitere Möglichkeit kann Glukonat durch die Glukonat-Kinase (Gox1709) (vgl. Abb. 63, gestrichelter Pfeil) zu 6-Phosphoglukonat phosphoryliert werden. Im Fall einer Phosphorylierung werden Glukose-6-Phosphat bzw. 6-Phosphoglukonat in den oxidativen Pentosephosphatweg überführt und dort über Enzyme des Pentosephosphatwegs und der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt (Rauch et al. 2010; Hanke et al. 2013; Richhardt et al. 2012). Pyruvat wird schließlich durch die Pyruvat-Decarboxylase (Gox1081) und die Acetaldehyd-Dehydrogenasen (Gox1122 und Gox2018) erst zu Acetaldehyd und dann zu Acetat verstoffwechselt (Krajewski et al. 2010; Richhardt et al. 2012; Peters et al. 2013). Der Entner-Doudoroff-Weg wird in *G. oxydans* nur geringfügig genutzt, weshalb der cytoplasmatische Abbau von Kohlenhydraten hauptsächlich über den Pentosephosphatweg erfolgt (Matsushita et al. 1994; Olijve und Kok 1979; Deppenmeier und Ehrenreich 2009). Die Art der Glukosemetabolisierung ist letztendlich abhängig von dem pH-Wert und der Glukosekonzentration im Medium (Olijve und Kok 1979). Unterhalb eines pH-Wertes von 3,5 im Medium ist der Pentosephosphatweg nachweislich nicht aktiv. Ab einem pH-Wert von 5,5 oder mehr als 15 mM Glukose wird die Umsetzung von Glukose (und auch Glukonat) über den Pentosephosphatweg ebenfalls unterdrückt. Stattdessen findet unter diesen Bedingungen die Oxidation von Glukose hauptsächlich an der mGDH und in geringeren Mengen durch die sGDH statt, wodurch 2- und 5-Ketoglukonat entstehen (Olijve und Kok 1979; Hanke et al. 2013). Erst unterhalb eines Schwellenwertes von 5-15 mM Glukose im Medium erfolgt die Metabolisierung über den Pentosephosphatweg (Olijve und Kok 1979).

#### **4.7.4 Abbau von 5-KF durch *Gluconobacter*-Stämme**

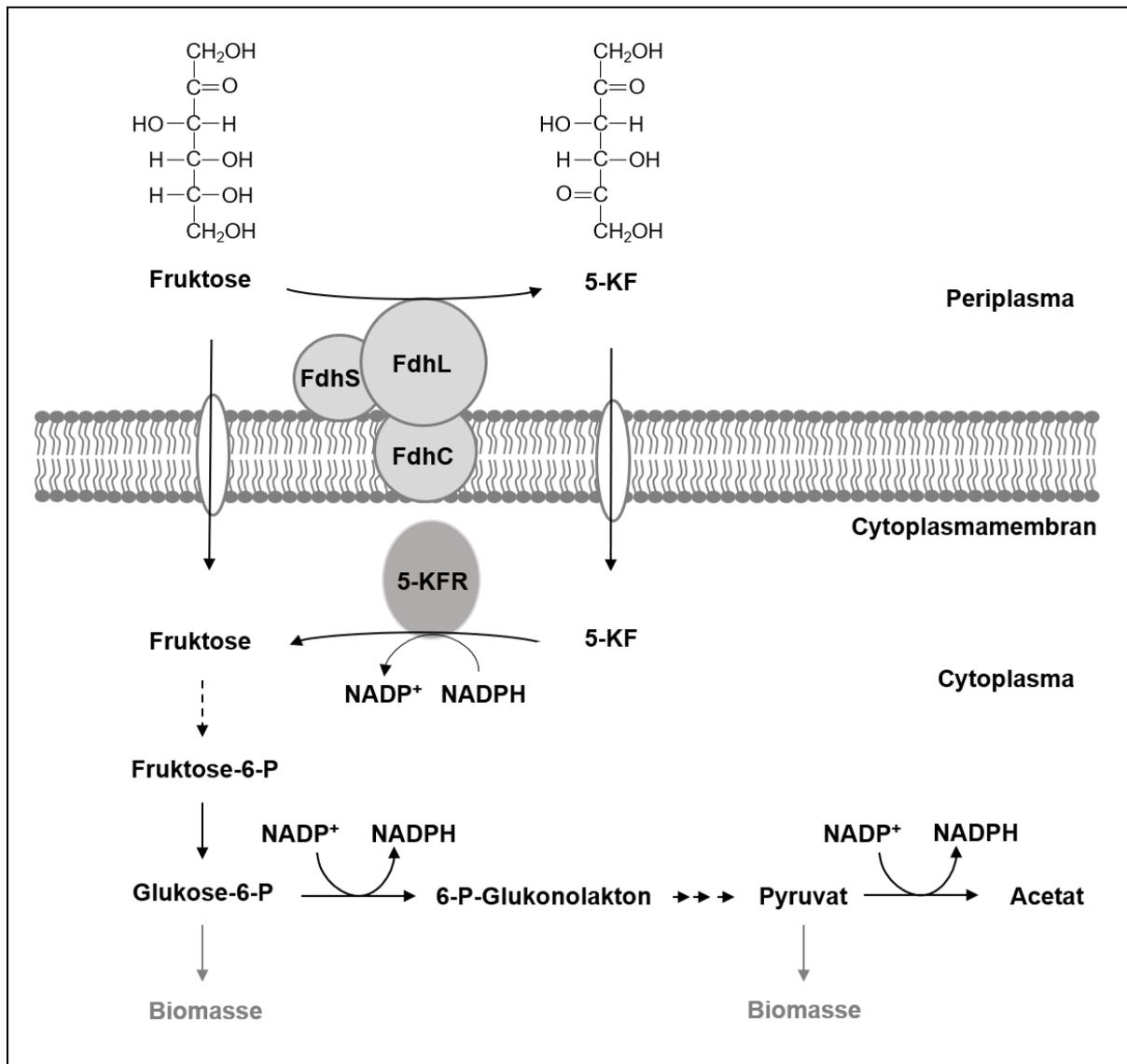
Die Verwertung des alternativen Süßstoffs 5-KF konnte in dieser Arbeit in verschiedenen Stämmen der Gattung *Gluconobacter* nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.4.4, Abb. 37). In allen Fällen fand der Abbau von 5-KF in der stationären Phase statt, zeigte aber deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen. Dabei fiel auf, dass die Organismen *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281, die bereits natürlicherweise zur Synthese von 5-KF befähigt waren, eine deutlich stärkere Reduktion der 5-KF-Konzentration aufwiesen, als *G. oxydans*. Ein Abbau der Verbindung in der Natur und das Vorhandensein entsprechender Enzyme in Wildtyp-Produzenten liegt nahe, um 5-KF in der stationären Phase zum Überleben als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können. Der Abbau in *G. oxydans* lässt jedoch vermuten, dass sich die Fähigkeit zur Reduktion auch auf Organismen übertragen lässt, die mit 5-KF in ihren natürlichen Habitaten in

Verbindung kommen. *G. oxydans* kommt in Blüten, Nektar und Früchten vor, weshalb ein Kontakt mit 5-KF als natürlicher Inhaltsstoff in Essig, Wein, Traubensaft, Holunderblütensirup und Honig (Burroughs und Sparks 1973; Barbe et al. 2001; Blasi et al. 2008; Siemen 2017) sehr wahrscheinlich ist. Damit 5-KF von *Gluconobacter*-Stämmen in der stationären Phase als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann, muss diese Verbindung in die Zelle aufgenommen werden (Matsushita et al. 1994). Anschließend erfolgt die Reduktion durch cytoplasmatischen Oxidoreduktasen, eine Phosphorylierung durch entsprechende Kinasen und schließlich der Übergang in den Pentosephosphatweg (Matsushita et al. 1994).

Ein Enzym, das eine Reduktion von 5-KF katalysiert, konnte bereits 1988 in *Tatumella (T.) citrea* (früher *Erwinia citreus*) identifiziert und als NADPH-abhängige 5-KF-Reduktase definiert werden (Schrimsher et al. 1988). Auch in Kultivierungen von *G. cerinus* in Fruktose-haltigem Medium konnte eine Abnahme von 5-KF beobachtet werden (Mowshowitz et al. 1974a, b). Dabei wurde vermutet, dass die Kombination aus 5-KF-Produktion und anschließender NADPH-abhängiger Reduktion einen wichtigen Zyklus zur Regeneration von NADP<sup>+</sup> während der Fruktoseverwertung des Stammes darstellt (Mowshowitz et al. 1974a, b). Analysen bereits charakterisierter Oxidoreduktasen aus *G. oxydans*, deren Hauptsubstrate organische Verbindungen mit Ketogruppen sind, führten schließlich zur Identifizierung der am 5-KF-Abbau beteiligten Enzyme (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.). Neben der  $\alpha$ -Ketocarboxyl-Reduktase Gox0644 (Schweiger et al. 2010) zeigte auch das 5-Ketoglukonat reduzierende Enzym Gox1432 (Zahid und Deppenmeier 2016) hohe Aktivitäten für das Substrat 5-KF (persönliche Mitteilung, Jacqueline Schiessl, M.Sc.). Diese Enzyme können daher als 5-KF-Reduktasen charakterisiert werden und sind höchstwahrscheinlich für den Abbau des alternativen Süßstoffs in Kultivierungen in dieser Arbeit verantwortlich. Die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen belegten zudem, dass homologe Enzyme zu den genannten 5-KF-Reduktasen in den Stämmen *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281, in denen eine starke Reduktion der 5-KF-Konzentration detektiert wurde, vorhanden sind (vgl. Kapitel 3.4.3.3 und 3.4.4).

Auf Grundlage dieser Daten wurde eine schematische Übersicht über den möglichen Metabolismus von 5-KF erstellt (Abb. 64). Nach der Aufnahme von 5-KF in die Zelle kann eine Reduktion der Verbindung an der Ketogruppe des C5-Atoms durch 5-KF-Reduktasen erfolgen, was nachweislich zur Bildung von Fruktose führt (Mowshowitz et al. 1974a; Schrimsher et al. 1988) (Abb. 64). Da es sich um eine NADPH-abhängige Reaktion handelt, wird dabei NADP<sup>+</sup> regeneriert, welches wiederum für die intrazellulären Umsetzung von Fruktose zu Acetat im Zuge des Pentosephosphatweges bereitgestellt wird (Mowshowitz et al. 1974a, b) (Abb. 64). Die bei der Reduktion entstandene Fruktose kann anschließend durch die Fruktokinase Gox0284 phosphoryliert und Fruktose-6-Phosphat durch die Glukose-6-Phosphat-Isomerase Gox1704 zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden (Abb. 64). Diese Verbindung kann dann in den oxidativen Pentosephosphatweg eingespeist und unter Bildung von NADPH zu 6-Phosphoglukonolaktolacton umgewandelt werden (Richhardt et al. 2012) (Abb. 64). Durch Enzyme des

Pentosephosphatwegs und der Glykolyse entsteht schließlich Pyruvat. Pyruvat kann durch Gox1081 zu Acetaldehyd decarboxyliert und anschließend durch die Acetaldehyd-Dehydrogenasen (Gox1122 und Gox2018) zu Acetat oxidiert werden (Krajewski et al. 2010; Peters et al. 2013). Aufgrund fehlender Phosphotransacetylasen und Acetat-Kinasen findet keine Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat in *G. oxydans* statt (Richhardt et al. 2012).



**Abbildung 64:** Schematische Übersicht des 5-KF-Abbaus in *G. oxydans*. 5-KF kann nach der periplasmatischen Produktion an der membranständigen FDH (FdhSCL im Schaubild, exemplarisch dargestellt) über spezifische Transporter in der Cytoplasmamembran (weiße Ovale) in die Zelle aufgenommen werden. Bei der cytoplasmatischen Reduktion von 5-KF durch 5-KF-Reduktasen entsteht D-Fruktose, welche anschließend phosphoryliert (gestrichelter Pfeil) und zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt wird. Durch Enzyme des Pentosephosphatwegs und der Glykolyse entsteht schließlich Pyruvat, das wiederum in zwei weiteren Schritten zu Acetat umgewandelt werden kann. Sowohl Glukose-6-Phosphat als auch Pyruvat können außerdem zur Bildung von Biomasse genutzt werden.

## 4.8 Möglichkeiten zur Optimierung des Ein-Stamm-Systems

### 4.8.1 Erstellen einer Doppelintegrationsmutante zur Steigerung der FDH-Aktivität

Um das Ein-Stamm-System *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  im Hinblick auf einen industriellen Einsatz noch effizienter zu gestalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Strategien zur Optimierung entwickelt. In diesem Zusammenhang war im ersten Schritt eine Verringerung der Kultivierungsdauer von 96 h notwendig, die mit *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  für eine effiziente 5-KF-Synthese benötigt wurde. Zudem sollte eine vollständige Fruktoseumsetzung und damit eine Steigerung der 5-KF-Ausbeute erzielt werden. Betrachtet man den Verlauf der 5-KF-Produktion in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$ , so wurde deutlich, dass in den ersten 30 h der Kultivierung eine effiziente Saccharosespaltung erfolgte, die 5-KF-Produktion jedoch verzögert ablief (vgl. Kapitel 3.4.6.2, Abb. 46). Zur Optimierung des Systems war daher einer Steigerung der 5-KF-Synthese durch die FDH von großem Interesse. Eine Verbesserung der Saccharosespaltung war zu diesem Zeitpunkt nicht notwendig. Die heterologe Produktion der FDH, als Schlüsselenzym der 5-KF-Produktion aus Fruktose, wurde in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\ inv$  durch ein chromosomal integriertes *fdhSCL*-Gencluster vermittelt (vgl. Kapitel 3.4.5.1). Durch enzymatische Tests konnte für das so produzierte Enzym eine Aktivität von  $404 \pm 10$  mU/mg Gesamtprotein ermittelt werden (vgl. Kapitel 3.4.5.2, Abb. 41). Dies war im direkten Vergleich in dieser Analyse lediglich 56 % der FDH-Aktivität des bisherigen Produktionsstammes *G. oxydans fdh* (Siemen et al. 2018) mit Plasmid-kodierten *fdhSCL*-Gencluster (vgl. Kapitel 3.4.5.2, Abb. 41). Diese Differenzen können durch eine erhöhte Kopienzahl der Plasmid-vermittelten FDH-Expression mit dem verwendeten pBBR1MCS-2-Vektor (Kovach et al. 1995) erklärt werden. Ein Vergleich der 5-KF-Produktion beider Stämme ausgehend von dem Substrat Fruktose verdeutlichte, dass die Unterschiede in der FDH-Aktivität sich auch in der Umsatzrate widerspiegeln. Während in Kultivierungen von *G. oxydans fdh* nach 30 h eine nahezu vollständige Umsetzung von 120 mM Fruktose zu 5-KF erzielt wurde (Siemen et al. 2018) (vgl. Kapitel 3.5.2, Abb. 50 C), konnten in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  zu diesem Zeitpunkt erst 40 mM 5-KF nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.4.5.3, Abb. 43 und Kapitel 3.5.2, Abb. 50 A).

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuteten darauf hin, dass eine Verkürzung der Fermentationszeit und damit eine Erhöhung der 5-KF-Produktionseffizienz durch eine Steigerung der FDH-Aktivität erfolgen könnte. Eine weitere Integration von *fdhSCL* in das Genom von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  stellte in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Möglichkeit dar. Das zweite *fdhSCL*-Gencluster sollte chromosomal an die Stelle des Gens *gox2015* eingebracht werden, welches für die lösliche Glukose-Dehydrogenase (sGDH) kodiert. Entsprechend entfällt in einem solchen Stamm die Produktion dieses Enzyms, wodurch die Metabolisierung von Glukose weiter eingeschränkt wird (Olijve und Kok 1979; Rauch et al. 2010; Richhardt et al. 2013) (vgl. Kapitel 4.7.3). Diese Modifizierung begünstigte damit auch den Einsatz einer Glukose-Isomerase, was ein Ziel des generellen 5-KF-Forschungsprojektes ist. Die Verwendung eines solchen Enzyms soll zukünftig dazu führen, dass neben Fruktose auch die aus der Saccharosespaltung resultierenden Glukoseeinheiten für die Produktion von 5-KF genutzt werden können. Dies würde

eine effizientere Substratnutzung und eine enorme Erhöhung der Produktausbeute ermöglichen. Im Detail wird auf dieses Vorhaben und die Funktionsweise von Glukose-Isomerasen in Kapitel 4.8.3 eingegangen.

Durch die zweite Integration des *fdhSCL*-Genclusters konnte die FDH-Aktivität des so generierten Stammes *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  im Vergleich zu *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  mehr als verdoppelt werden (vgl. Kapitel 3.5.1, Abb. 48). Zudem konnte die Produktionszeit von 96 h auf 28 h reduziert und damit die 5-KF-Synthese aus dem Substrat Fruktose deutlich optimiert werden (vgl. Kapitel 3.5.2, Abb. 51). Die genomische Modifikation in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  resultierte zusätzlich in einer vollständigen Fruktoseumsetzung und führte dadurch zu der gewünschten Steigerung der 5-KF-Ausbeute. Mit diesem Stamm lag außerdem eine Verbesserung zu dem bisherigen Plasmid-basierten Produktionsstamm *G. oxydans fdh* (Siemen et al. 2018) vor (vgl. Kapitel 3.5.2, Abb. 51). Der Doppelintegrationsstamm ermöglicht damit zukünftig einen effizienten 5-KF-Produktionsprozess mit Fruktose als Substrat. Durch die chromosomal integrierten *fdh*-Gencluster und der daraus resultierenden hohen FDH-Aktivität, kann die Produktion von 5-KF außerdem ohne den Einsatz eines Antibiotikums erfolgen, was aus industrieller Sicht einen enormer Vorteil darstellt.

Eine Verbesserung der 5-KF-Synthese aus dem alternativen Substrat Saccharose konnte mit *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  jedoch nicht erfolgen, was in einer deutlich reduzierten Saccharosespaltung begründet lag (vgl. Kapitel 3.5.3.1, Abb. 56 A). Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte die Vermutung formuliert werden, dass die geringere Hydrolyse des Disaccharids mit der zweiten chromosomalen Integration des *fdh*-Operons korrelierte. Hierbei kam es offensichtlich zu einer geringeren Produktion von Inv1417 oder zu einer verminderten Translokation des Enzyms über die Cytoplasmamembran. Diese Theorie ergab sich daher, dass eine verringerte Saccharosespaltung lediglich in den FDH-Doppelintegrationsstämmen *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  und *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv*, nicht aber im Fall einer einzelnen FDH-Integration in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 3.5.3.1, Abb. 56 A). Möglicherweise lag in den Doppelintegrationsstämmen eine reduzierte Translokationseffizienz von Inv1417 vor, die dann in einer geringeren Hydrolyse im Periplasma resultierte. Betrachtet man den Transport der Schlüsselenzyme FDH und Inv1417, so fällt auf, dass mehrere Protein-Transportmechanismen im Zuge des 5-KF-Produktionsprozesses aus Saccharose erfolgen müssen. Der FdhSCL-Proteinkomplex wird sowohl Tat-abhängig als auch Sec-vermittelt ins Periplasma transportiert (Kawai et al. 2013). FdhS und FdhL werden wahrscheinlich gemeinsam, vermittelt durch das Signalpeptid der Untereinheit FdhS, über den Tat-abhängigen Transportweg transloziert (Kawai et al. 2013). FdhC hingegen weist eine Sec-Signalsequenz auf (Ameiyama et al. 1981; Kawai et al. 2013) und gelangt daher vermutlich Sec-abhängig ins Periplasma. Die Zusammenlagerung der einzelnen Proteine zum vollständigen Komplex erfolgt entsprechend erst nach der Sekretion. Diese Art des separaten Transportes einzelner Proteinuntereinheiten (auch über verschiedene Transportwege) ist jedoch nicht

ungewöhnlich und für mehrere Proteinkomplexe beschrieben (Simon et al. 1998; Gross et al. 2001, Berks et al. 2003). Da auch für Inv1417 ein Tat-Signalpeptid identifiziert werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.1, Abb. 11 und Kapitel 4.6.3), wurden vermutlich sowohl FdhS und FdhL, als auch Inv1417 Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert. Wie bereits erläutert, ermöglicht der Tat-abhängige Transportweg die Sekretion (teil-) gefalteter Proteine oder Proteinkomplexe mit prosthetischen Gruppen oder Cofaktoren (Berks 1996; Berks et al. 2002; Lee et al. 2006; Hou und Brüser 2011; Nuñez et al. 2012) (vgl. Kapitel 4.6.3). Obwohl Inv1417 keinen Cofaktor oder eine prosthetische Gruppe besaß, konnte eine Sekretion über die Cytoplasmamembran erfolgen und im Zuge dieser Arbeit nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.4.6.1, Abb. 44). Die Möglichkeit des Tat-vermittelten Transportes von Proteinen ohne Cofaktor, wie Inv1417 in dieser Arbeit, ist in mehreren Studien beschrieben (Berks 1996; Berks et al. 2002; Dilks et al. 2003; Berks et al. 2005) (vgl. Kapitel 4.6.3). Vermutlich werden in diesen Fällen jedoch Proteine, die einen entsprechenden Cofaktor oder einer prosthetische Gruppe aufweisen, bevorzugt transportiert (Berks et al. 2005). Da nur 40,6 % der Aktivität von Inv1417 im Periplasma von *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  detektiert wurde (vgl. Kapitel 3.4.6.1), deutet dies auf eine verminderten Translokation hin und könnte auf die Theorie eines bevorzugten Transportes nach Berks et al. (2005) zurückzuführen sein. Demnach könnte in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$ , aufgrund der prosthetischen Gruppe FAD, primär der Tat-vermittelte Transport von FdhS und FdhL über die Cytoplasmamembran erfolgt sein, während Inv1417 ohne Cofaktor entsprechend zweitrangig sekretiert wurde. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität der Invertase reichten im Fall des Ein-Stamm-Systems *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh inv$  jedoch diese 40,6 % für eine effiziente Saccharosespaltung aus. Die Integration eines zweiten *fdhSCL*-Genclusters in das Genom der Doppelintegrationsstämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  und *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* resultierte entsprechend in einer deutlich erhöhten Translation der FDH, wodurch der Transport von Inv1417 über die Cytoplasmamembran weiter eingeschränkt werden könnte. Dies würde im Rückschluss zu einer verringerten Saccharosespaltung führen und könnte die Beobachtungen in den Analysen der Stämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh inv$  und *G. oxydans* IK003.1::*fdhSCL*<sup>2</sup> *inv* erklären (vgl. Kapitel 3.5.3.1, Abb. 56 A).

Als weitere Möglichkeit für das Ausbleiben einer effizienten Saccharosespaltung in den Doppelintegrationsstämmen war außerdem eine Überlastung der Tat-Maschinerie denkbar. Der Transportprozess sieht vor, dass gefaltete Proteine erst über das Signalpeptid an die TatC-Einheit des TatBC-Komplexes binden und anschließend nach Assemblierung mit TatA (Energieabhängig) über die Cytoplasmamembran transportiert werden (de Leeuw et al. 2002; Mori und Cline 2002; Alami et al. 2003; Brüser und Sanders 2003; Natale et al. 2008). TatA muss sich anschließend von dem TatBC-Komplex lösen und erst dann kann ein neuer Transportzyklus beginnen (Mori und Cline 2002). Eine begrenzte Kapazität des Signalpeptid-abhängigen Transportes konnte in mehreren Studien beschrieben werden (Rosenberg 1998; Mergulhao und Monteiro 2004; Terpe 2006; De Keersmaecker et al. 2006), was die Vermutung eines ähnlichen Problems im Zuge dieser Arbeit unterstreicht. Häufig lag dies an einer unzureichenden Kapazität der Exportmaschinerie

(Rosenberg 1998; Mergulhao und Monteiro 2004; De Keersmaecker et al. 2006). Dies ist vor allem bei rekombinanten Proteinproduktionen durch den Einsatz starker Promotoren bei der Transkription bekannt und führt bei Überlastung des Sekretionsapparates zu einer Anhäufung der Proteine im Cytoplasma (Rosenberg 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Expression der FDH, als auch Inv1417 durch den starken, konstitutiven Promotor p264 (Kallnik et al. 2010) vermittelt, weshalb auch eine Überlastung des Tat-Apparates als möglicher Grund nicht ausgeschlossen werden kann. Zuletzt kann in diesem Zusammenhang erneut ein Abbau der zahlreichen, bereits gefalteten Proteine im Cytoplasma durch Proteasen (Georgiou und Valax 1996, Sørensen und Mortensen 2005) eine mögliche Erklärung sein (vgl. Kapitel 4.5). Um zu bestätigen, dass die reduzierte Saccharosespaltung in den Doppelintegrationsstämmen mit einem unzureichenden Proteintransport zusammenhängt, kann eine Zellfraktionierung und eine Bestimmung der Aktivität von Inv1417 in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  *inv* erfolgen. Sollten dabei im Vergleich zu *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  *inv* erhöhte Aktivitäten des Enzyms im Cytoplasma und geringere im Periplasma bestimmt werden, würde dies ein generelles Transportproblem und eine Verbindung zur zweiten FDH-Integration bestätigen.

#### **4.8.2 Umstrukturierung des Systems durch chromosomale Integration von *inv1417***

Um zukünftig Problemen einer unzureichenden Transporteffizienz entgegenzuwirken, wurden in dieser Arbeit erste Vorbereitungen für eine mögliche Umstrukturierung des Expressionsstammes durchgeführt. Da mehrere Studien eine Entlastung der Exportmaschinerie durch die Verwendung schwächerer Promotorsysteme für die heterologen Proteinproduktion vorhersagen (Rosenberg 1998; Mergulhao und Monteiro 2004; Terpe 2006), sollte diese Strategie auch für das Ein-Stamm-System angewendet werden. Die chromosomale Integration von p264-*inv1417* und der Einsatz eines schwächeren Promotors für die FDH-Produktion könnten in Kombination die Tat-Maschinerie entlasten und den Transport von Inv1417, der vermutlich mit FdhS und FdhL konkurrierte, erhöhen. Mit Hinblick auf den Einsatz einer Glukose-Isomerase in den finalen Produktionsprozess erschien es sinnvoll, das Gen *inv1417* erneut anstelle der Gene *gox0265* und *gox2015* ins Genom zu integrieren. Als Voraussetzung zur Generierung eines effizienten Ein-Stamm-Systems nach diesem Prinzip, musste jedoch sichergestellt werden, dass eine ausreichend hohe Aktivität der FDH im Zuge der geplanten Umstrukturierung erhalten blieb. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegten, dass die Plasmid-vermittelte Expression des *fdhSCL*-Genlusters durch den moderaten, konstitutiven p452-Promotor (Kallnik et al. 2010) in einer ausreichend hohen FDH-Aktivität resultierte (vgl. Kapitel 3.5.3.2, Abb. 57). Diese konnte zwischen die Effizienz der Stämme *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  und *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  eingeordnet werden und führte nachweislich zu einer Verbesserung der 5-KF-Synthese und Produktionszeit im Vergleich zum bisherigen Ein-Stamm-System (vgl. Kapitel 3.5.3.2, Abb. 58). Die Generierung eines Expressionsstammes nach dieser Strategie ist daher durchaus sinnvoll und soll in nachfolgenden Arbeiten im Zuge einer zweiten Förderungsphase des 5-KF-Forschungsvorhabens durchgeführt werden.

Ein anderer vielversprechender Ansatz wäre die Verwendung eines induzierbaren Promotorsystems. Diese Vektoren werden häufig eingesetzt, um eine gezielte Regulation der Proteinproduktion zu einem gewünschten Zeitpunkt zu ermöglichen (Guzman et al. 1995). Mit einem solchen System könnte im ersten Schritt die Saccharosespaltung durch eine konstitutive Genexpression von *p264-inv1417* erfolgen und anschließend durch Induktion eine zeitlich getrennte Produktion der FDH zur Synthese von 5-KF durchgeführt werden. Die Integration von *inv1417* ins Genom von *G. oxydans* wäre dafür weiterhin notwendig. Allgemein findet die Kontrolle der Genexpression in diesen Systemen durch den Einsatz regulierbarer Expressionsvektoren mit induzierbaren Promotoren, wie beispielsweise  $P_{TAC}$ ,  $P_{T7}$ ,  $P_{LAC}$  oder  $P_{BAD}$  (De Boer et al. 1983; Tabor und Richardson 1985; Guzman et al. 1995) statt. Durch die Zugabe spezifischer Induktoren zu einem bestimmten Zeitpunkt kann die Proteinproduktion eingeleitet werden. Für die Gattung *Gluconobacter* war bisher kein ausreichend funktionelles System dieser Art bekannt (Florea et al. 2016; Teh et al. 2019; Fricke et al. 2020), weshalb im Zuge der vorliegenden Arbeit noch keine Versuche zu einer induzierbaren Genexpression durchgeführt wurden. Vor kurzem konnte jedoch ein L-Arabinose induzierbares System entwickelt werden, das eine effiziente, regulierbare Genexpression in *G. oxydans* ermöglicht (Fricke et al. 2020). Dieses Expressionsplasmid basiert auf dem pBBR1-Vektor (Kovach et al. 1995) und beinhaltet den  $P_{BAD}$ -Promotor des Arabinose-Operons aus *E. coli* sowie das regulatorische Gen *araC* (Casadaban 1976; Fricke et al. 2020). Das generelle Prinzip des Systems ist in *E. coli* seit Jahren gut untersucht (Lee et al. 1987; Lobell und Schleif 1990; Soisson et al. 1997). Die Genexpression wird dabei durch das Protein AraC reguliert, das sowohl als positiver als auch negativer Regulator agieren kann (Lobell und Schleif 1990). In Anwesenheit von Arabinose induziert AraC die Transkription, fehlt Arabinose hingegen, so wirkt AraC als Repressor (Lee et al. 1987; Lobell und Schleif 1990). Diese Repression erfolgt durch eine Schleifenbildung der DNA, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase inhibiert wird (Soisson et al. 1997; Schleif 2010). In *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass die Öffnung dieser Schleife nicht nur, wie gewünscht, durch Arabinose vermittelt wird, sondern auch durch das cAMP-Rezeptorprotein (CRP) erfolgen kann. Die Regulation der Genexpression wird daher durch CRP negativ beeinflusst (Schleif 2010).

Um das induzierbare System in *G. oxydans* verwenden zu können, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Als erstes muss die Aufnahme des Induktors L-Arabinose in die Zelle möglich sein, um dort den Transkriptionsregulator AraC zu binden (Schleif 2010). Da *G. oxydans* in der Lage ist, L-Arabinose periplasmatisch durch die mGDH in Arabinonsäure umzusetzen (Mientus et al. 2017; Peters et al. 2013), würde eine Induktion des Systems entfallen. Liegt eine Deletion des mGDH kodierenden Gens *gox0265* vor, kann eine effiziente Genregulation durch das L-Arabinose-Operon ermöglicht werden (Fricke et al. 2020). Durch die Konstruktion des Ein-Stamm-Systems, in dem eine Deletion von *gox0265* durch die chromosomale Integration von *inv1417* geplant ist, wäre daher die erste Voraussetzung bereits erfüllt. Als nächstes muss bedacht werden, dass L-Arabinose in *E. coli* durch die Proteine AraA, AraB und AraD metabolisiert werden kann. Dabei wird L-Arabinose zu L-Ribulose isomerisiert, anschließend phosphoryliert und letztlich

als D-Xylulose-5-Phosphat in den Pentosephosphatweg eingespeist (Englesberg 1961; Englesberg et al. 1962). Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass L-Arabinose als Induktor auf diesem Weg in *G. oxydans* verloren geht, da entsprechende Gene für die Produktion von AraABD-homologen Proteinen nicht im Genom enthalten sind (Fricke et al. 2020). Als letzte Voraussetzung kann bestätigt werden, dass eine Auflösung der DNA-Schleife durch ein cAMP-bindendes Protein der CRP-Familie in *G. oxydans* nicht erfolgt (Fricke et al. 2020), weshalb das System in allen Fällen für den Einsatz im Ein-Stamm-System geeignet ist.

#### **4.8.3 Steigerung der 5-KF-Ausbeute durch Integration einer Glukose-Isomerase in den Produktionsprozess**

Im bisherigen 5-KF-Herstellvorgang aus dem Substrat Saccharose wurden bisher lediglich die aus der Spaltung resultierenden Fruktoseeinheiten und damit nur die Hälfte aller verfügbaren Zuckereinheiten, zur Synthese des alternativen Süßstoffs verwendet. Um auch die verbleibende Glukose effizient nutzen zu können, ist der Einsatz einer Glukose-Isomerase wünschenswert und im Zuge einer zweiten Förderungsphase des 5-KF-Forschungsprojekts im Jahr 2021 geplant. Glukose-Isomerasen werden häufig zur Herstellung des sogenannten "High Fructose Corn Syrup" (HFCS), einem Fruktose-Glukose-Gemisch das als alternative Süße in Lebensmitteln verwendet wird, eingesetzt (Bhosale et al. 1996; Parker et al. 2010). Die Umwandlung von Glukose zu Fruktose erfolgt in solchen Prozessen bei einer Temperatur von 60 °C (Jensen und Rugh 1987; Bhosale et al. 1996), wobei eine Verbesserung der Umwandlungseffizienzen unter höheren Temperaturen beschrieben ist (Fatima und Hussain 2015; Jia et al. 2017; Jin et al. 2017). Mit Hilfe eines solchen Enzyms wäre daher auch im 5-KF-Produktionsprozess eine Isomerisierung von Glukose zu Fruktose denkbar und würde zu einer enormen Ertragssteigerung führen. Um im Hinblick darauf die Umwandlung von Glukose durch eine Glukose-Isomerase zu ermöglichen, musste die Fähigkeit zur Metabolisierung des Monosaccharids im Expressionsstamm auf ein Minimum reduziert werden. Durch die Deletion der Gene *gox0265* in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh inv* sowie zusätzlich *gox2015* in *G. oxydans*  $\Delta$ *mgdh::fdh* $\Delta$ *sgdh::fdh* wurde damit im Zuge der vorliegenden Arbeit eine Grundlage für dieses Vorhaben geschaffen.

Die Identifizierung einer geeigneten Glukose-Isomerase gestaltete sich jedoch schwierig. Dies kann dadurch begründet werden, dass es sich bei Enzymen dieser Klasse grundsätzlich um Xylose-Isomerasen handelt, die primär die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose katalysieren (Wong 1995). Als unspezifische Nebenreaktion kann eine Umsetzung von D-Glukose zu D-Fruktose erfolgen (Wong 1995), weshalb Xylose-Isomerasen jedoch für das Substrat Glukose meist hohe  $K_M$ -Werte und Temperaturoptima aufweisen (Danno 1970). Bei der Isomerisierung von Glukose zu Fruktose handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion (Gaily et al. 2010), sodass eine Umwandlung der Monosaccharide so lange ablaufen kann, bis diese zu ungefähr gleichen Anteilen im Reaktionsansatz vorliegen (Kikkert et al. 1981; Gaily et al. 2010). Bezogen auf die Integration einer Glukose-Isomerase in den 5-KF-Produktionsprozess würde dies bedeuten, dass theoretisch nur die Hälfte der aus der Saccharosespaltung resultierenden Glukoseeinheiten zu

Fruktose umgewandelt werden könnten. Dies ist jedoch nicht der Fall, da Fruktose, durch die Oxidation zu 5-KF an der FDH, permanent dem Gleichgewicht entzogen werden kann und somit theoretisch nahezu die gesamte Glukose genutzt werden könnte. Als notwendige Voraussetzung für den Einsatz in den 5-KF-Produktionsprozess muss ein potentiell geeignetes Enzym, entsprechend der Kultivierungsbedingungen des Expressionsstammes *G. oxydans*, ausreichend hohe Aktivitäten bei einer Temperatur von 30 °C und pH-Werten zwischen 4 - 7 aufweisen. Der  $K_M$ -Wert sollte unter 100 mM liegen, damit eine effiziente Umsatzrate zu jeder Zeit der Kultivierung vorliegt. Nach derzeitigem Wissensstand ist unter den bisher beschriebenen Xylose-Isomerasen, die nachweislich eine Umwandlung von Glukose zu Fruktose katalysieren, kein geeignetes Enzym vorhanden, das alle Parameter erfüllt. Eine exemplarische Zusammenfassung potentieller Glukose-Isomerasen kann Tabelle 11 entnommen werden.

**Tabelle 11:** Auszug potentieller Isomerasen mit beschriebener Aktivität für das Substrat Glukose

<b>Organismus</b>	<b><math>K_M</math> für Glukose</b>	<b>Temperatur</b>	<b>pH-Optimum</b>
<i>Anoxybacillus gonensis</i> (Karaoglu et al. 2013)	146 mM	85 °C	6,5
<i>Bacillus coagulans</i> HN-68 (Danno 1970)	90 mM	60 - 70 °C	7
<i>Escherichia coli</i> K-12 (Rozanov et al. 2009)	220 mM	45 °C	6,8
<i>Lactobacillus brevis</i> (Yamanaka 1975)	920 mM	50 °C	6 - 7
<i>Lactobacillus reuteri</i> (Staudigl et al. 2014)	1099 mM	60 - 70 °C	5
<i>Streptomyces albus</i> (Liu et al. 2015)	86 mM	75 °C	7 - 9
<i>Streptomyces chibaensis</i> (Joo et al. 2005)	83 mM	85 °C	7
<i>Thermus thermophilus</i> (Lönn et al. 2002)	130,8 mM	85 °C	7
<i>Thermotoga neapolitana</i> (Harris et al. 2010)	148,9 mM	95 °C	7

Das Enzym aus *E. coli* K-12 lag mit einem Temperaturoptimum von 45 °C zumindest annähernd an der verwendeten Kultivierungstemperatur des Produktionsstammes (Tab. 11), der ermittelte  $K_M$ -Wert von 220 mM für das Substrat Glukose war jedoch zu hoch für den geplanten Einsatz. Dass dieses Enzym für die 5-KF-Produktion ungeeignet war, belegten zudem die Ergebnisse einer früheren Arbeit, in der bei einer Temperatur von 30 °C keine Aktivität für das Substrat Glukose

nachgewiesen werden konnte (Zahid 2017). Bessere Affinitäten lagen für die Isomerasen der Stämme *Bacillus coagulans* HN-68 (Danno 1970), *Streptomyces albus* (Liu et al. 2015) und *Streptomyces chibaensis* (Joo et al. 2005) mit  $K_M$ -Werten unter 100 mM Glukose vor (Tab. 11). Aufgrund der geringen Aktivitäten bei einer Temperatur von 30 °C, eigneten sich diese jedoch auch nicht für den Einsatz im 5-KF-Produktionsprozess. Für die Enzyme der thermophilen Organismen *Thermus thermophilus* (Lönn et al. 2002) und *Thermotoga neapolitana* (Harris et al. 2010) konnte bei einer Temperatur von 30 °C keine Aktivität ermittelt werden, weshalb eine Verwendung dieser Isomerasen ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

Für die Isomerase XylA aus *A. gonensis* NCIMB 13933 war eine Umwandlung von Glukose zu Fruktose unter spezifischen Bedingungen bekannt (Karaoglu et al. 2013). Das Enzym wies für das Monosaccharid einen  $K_M$ -Wert von  $146.08 \pm 9.50$  mM und ein  $V_{max}$  von  $43.72 \pm 1.01$  U/mg Protein auf (Karaoglu et al. 2013). Das pH-Optimum lag bei pH 6,5, was mit den Kultivierungsbedingungen von *G. oxydans* in der 5-KF-Produktion übereinstimmte. Das Temperaturoptimum wurde bei 85 °C bestimmt (Tab. 11), eine Restaktivität von etwa 20 % konnte jedoch auch bei 30 °C beschrieben werden (Karaoglu et al. 2013). Der hohe  $K_M$ -Wert von 146 mM eignete sich nicht optimal für den Einsatz im Produktionsprozess, allerdings belegten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine Synthese von 5-KF auch unter hohen Zuckerkonzentrationen möglich war (vgl. Kapitel 3.5.2, Abb. 53). Eine detaillierte Charakterisierung des aufgereinigten Enzyms XylA sowie Versuche zur Anpassung des Temperaturoptimums an mesophile Kultivierungsparameter, erfolgten im Zuge einer Masterarbeit von Laura Garschagen. Daraus ergab sich für das native Enzym mit dem Substrat Glukose bei 30 °C eine spezifische Aktivität von 2,5-5 mU/mg Protein (persönliche Mitteilung, Laura Garschagen, M.Sc.). Bei Erhöhung der Temperaturen im verwendeten Enzymassay, konnte eine deutliche Steigerung der Aktivität von XylA ermittelt werden, die mit den Ergebnissen von Karaoglu et al. (2013) vergleichbar war. Diese Beobachtung verdeutlichte die Auswirkung der eingesetzten Temperatur auf die Aktivität der Isomerase. Da eine Kälte-Adaption von XylA und damit einhergehend eine Aktivitätssteigerung bei 30 °C bisher nicht möglich war (persönliche Mitteilung, Laura Garschagen, M.Sc.), ist auch dieses Enzym nicht für die Umwandlung von Glukose zu Fruktose im Zuge der 5-KF-Produktion geeignet. Eine Erhöhung der Temperatur im Produktionsprozess zur Steigerung der Aktivität der Glukose-Isomerase ist aufgrund der Kultivierungsparameter von *G. oxydans* und dem Aktivitätsoptimum der FDH auszuschließen. Das Temperaturoptimum des membranständigen Enzyms liegt zwischen 25 und 30 °C und bei einer Erhöhung der Temperatur auf 35 °C kann bereits ein starker Aktivitätsverlust beobachtet werden (Ameyama et al. 1981). Die Suche nach anderen potentiellen Glukose-Isomerasen oder die Kälteanpassung bekannter Enzyme aus thermophilen Organismen, ist daher weiterhin von großem Interesse im Zuge einer effizienteren Substratnutzung und einer Optimierung der 5-KF-Ausbeute.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung und Optimierung eines effizienten bakteriellen Produktionsverfahrens für den alternativen Süßstoff 5-Ketofruktose (5-KF). Dieses Fruktosederivat stellt eine vielversprechende Möglichkeit zum Austausch kalorienreicher Zucker und synthetischer Süßungsmittel in Lebensmitteln dar. 5-KF besitzt eine vergleichbare Süßkraft wie Fruktose und kommt natürlicherweise bereits in einigen Konsumgütern vor. Die Synthese von 5-KF aus Fruktose erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe bakterieller Expressionssysteme durch die heterologe Produktion der membrangebundenen Fruktose-Dehydrogenase (FDH) in verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen. Um angelehnt an den bisherigen Herstellungsprozess ein industriell angepasstes Verfahren zur Synthese von 5-KF auch aus dem alternativen und kostengünstigen Substrat Saccharose zu ermöglichen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein *Gluconobacter*-basiertes Ein-Stamm-System entwickelt.

Als initialer und notwendiger Schritt der 5-KF-Produktion aus Saccharose war eine effiziente Spaltung des Disaccharids erforderlich. Diese Reaktion gewährleistete das Vorliegen freier Fruktoseeinheiten, die wiederum das Substrat für die Oxidation von 5-KF durch die FDH darstellten. Die Hydrolyse von Saccharose durch die Sucrase SacC konnte als eine der größten Schwachstellen des bisherigen Zwei-Stamm-Systems (Siemen et al. 2018) ermittelt werden, das in früheren Studien zur Erweiterung der 5-KF-Produktion aus Saccharose etabliert wurde. Eine Optimierung dieses initialen Schrittes konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Identifizierung einer Invertase aus *G. japonicus* LMG 1417 (Inv1417) erfolgen. Bei der Charakterisierung dieses Enzyms konnte ermittelt werden, dass Inv1417 die höchste spezifische Aktivität unter allen bisher beschriebenen Invertasen im mesophilen Temperaturbereich aufwies ( $V_{\max} = 2295 \pm 243$  U/mg Protein). Der Einsatz von Inv1417 in den 5-KF-Produktionsprozess führte daher zu einer deutlich effizienteren Saccharosespaltung und ersetzte deshalb das bisherige Enzym SacC des Zwei-Stamm-Systems. Die Verwendung von Inv1417 als hydrolytisches Enzym erlaubt zukünftig auch eine Erweiterung der 5-KF-Produktion auf die Fruktose-haltigen Verbindungen Raffinose, 1-Kestose sowie Levanbiose und Levantriose. Vor allem Raffinose ist in diesem Zusammenhang ein vielversprechendes Substrat, da die Hydrolyse des Trisaccharids einerseits die Synthese von 5-KF ermöglichen könnte und zusätzlich zur Akkumulation des kostspieligen und industriell relevanten Präbiotikums Melibiose führen würde.

Durch den Nachweis eines homologen Enzyms zu Inv1417 und einem chromosomal integrierten *fdh*-Operon zur Produktion der FDH, konnte mit *G. japonicus* LMG 26773 ein erstes Ein-Stamm-System zur Produktion von 5-KF aus Saccharose identifiziert werden. Kultivierungen des Wildtyp-Stammes in Saccharose-haltigem Medium führten zu einer 5-KF-Ausbeute von bis zu 40 %. Als Gründe für die relativ geringe Ausbeute konnte sowohl ein starker Abbau des Produktes in der zweiten Wachstumsphase, als auch die Bildung von Levan aus Fruktoseeinheiten ermittelt werden. Als unveränderter Wildtyp-Produzent ist *G. japonicus* LMG 26773 dennoch sehr vielversprechend. Durch den Einsatz des Stammes im Lebensmittelbereich könnte einerseits eine Umwandlung der

kalorienreichen Zucker Saccharose und Fruktose zu 5-KF stattfinden, was eine Reduktion des kalorischen Nährwertes unter Erhalt des süßen Geschmacks ermöglichen würde. Gleichzeitig könnte durch die Synthese des Nebenproduktes Levan ein zusätzlicher präbiotischer Effekt herbeigeführt werden.

Das Auftreten einer 5-KF-Reduktion in verschiedenen *Gluconobacter*-Stämmen während des Produktionsprozesses erschwerte die Generierung eines effizienten, industriell einsetzbaren Expressionssystems. In allen analysierten Stämmen fand ein Abbau des Produktes 5-KF in der stationären Wachstumsphase statt, zeigte jedoch Differenzen in der Intensität. In *G. japonicus* LMG 26773 und *G. japonicus* LMG 1281, die bereits als Wildtyp chromosomal das *fdhSCL*-Gencluster trugen, lag eine starke Reduktion von 5-KF vor. Der Abbau der Verbindung in *G. oxydans*-Stämmen war hingegen nur sehr gering, weshalb sich *G. oxydans* 621H als geeignete Basis zur Generierung eines Produktionsorganismus für ein industrielles Verfahren erwies. Nachdem eine Plasmid-vermittelte Co-Produktion der Schlüsselenzyme FDH und Inv1417 nicht möglich war, stellte sich die Kombination aus chromosomaler Integration des *fdh*-Operons und Plasmid-vermittelter Produktion von Inv1417 in *G. oxydans* 621H als erfolgreiche Strategie heraus. Durch diese Modifizierungen konnte mit *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  *inv* schließlich ein effizientes Ein-Stamm-System für die biotechnologische Herstellung des alternativen Süßstoffs aus Saccharose entwickelt werden. Insgesamt wurden damit  $84 \pm 2$  % der aus der Saccharosespaltung resultierenden Fruktoseeinheiten zu 5-KF umgewandelt.

Darüber hinaus konnte die bisherige 5-KF-Produktion aus dem Substrat Fruktose für den industriellen Einsatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter optimiert werden. Eine zweite chromosomale Integration des *fdh*-Operons in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  führte zu einer deutlich verkürzten Fermentationszeit und einer erhöhten 5-KF-Ausbeute im Vergleich zu allen bisherigen Produktionsverfahren. Der so generierte Stamm *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  kann daher zukünftig in der industriellen Herstellung das Plasmid-basierte System *G. oxydans fdh* (Siemen et al. 2018) ersetzen und ermöglicht damit eine antibiotikafreie Synthese von 5-KF.

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Expressionsstämme bringen zudem einen weiteren Vorteil mit sich. Durch die Deletion der Gene *gox0265* in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh$  *inv* sowie zusätzlich *gox2015* in *G. oxydans*  $\Delta mgdh::fdh\Delta sgdh::fdh$  konnte eine Grundlage für die Integration einer Glukose-Isomerase in den 5-KF-Produktionsprozess geschaffen werden. In einer zweiten Förderungsphase des Forschungsprojekts ist der Einsatz eines solchen Enzyms geplant, um neben Fruktose auch die aus der Saccharosespaltung resultierenden Glukoseeinheiten zu 5-KF umsetzen zu können. Dies würden neben einer effizienteren Substratnutzung auch eine enorme Erhöhung der Produktausbeute ermöglichen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe, T.; Horiuchi, K.; Kikuchi, H.; Aritsuka, T.; Takata, Y.; Fukushi, E., Fukushi, Y.; Kawabata, J.; Ueno, K.; Onodera, S.; Shiomi, N. (2012): Structural confirmation of oligosaccharides newly isolated from sugar beet molasses. *Chemistry Central Journal* 6 (1), S. 89.
- Adachi, O.; Nguyen, T. M.; Hours, R. A.; Kataoka, N.; Matsushita, K.; Akakabe, Y.; Yakushi, T. (2020): 5-Keto-D-fructose production from sugar alcohol by isolated wild strain *Gluconobacter frateurii* CHM 43. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 84 (8), S. 1745-1747.
- Adamberg, K.; Adamberg, S.; Ernits, K.; Larionova, A.; Voor, T.; Jaagura, M.; Visnapuuc, T.; Alamäe, T. (2018): Composition and metabolism of fecal microbiota from normal and overweight children are differentially affected by melibiose, raffinose and raffinose-derived fructans. *Anaerobe* 52, S. 100-110.
- Alami, M.; Lüke, I.; Deitermann, S.; Eisner, G.; Koch, H. G.; Brunner, J.; Müller, M. (2003): Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 12 (4), S. 937-946.
- Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1981): D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*. Purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. *Journal of Bacteriology* 145 (2), S. 814-823.
- Antosova, M.; Polakovic, M. (2001): Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chemical Papers* 55 (6), S. 350-358.
- Aragno, M.; Mastrocola, R. (2017): Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: emerging mechanisms of disease. *Nutrients*, 9 (4), S. 385.
- Armstrong, J. M. (1964): The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* 86 (1), S. 194-197.
- Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Fernandes, G. R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.; Bertalan, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Manichanh, C.; Nielsen, H. B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poulain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E. G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; de Vos, W. M.; Brunak, S.; Doré, J.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Bork, P. (2011): Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 (7346), S. 174-180.
- Ashok, I.; Sheeladevi, R.; Wankhar, D. (2014): Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4 (1), S. 39-43.
- Avigad, G.; England, S. (1975): 5-Keto-D-fructose and its phosphate esters. *Methods in Enzymology* 41, S. 84-90.
- Baneyx, F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5), S. 411-421.
- Baneyx, F.; Mujacic, M. (2004): Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22 (11), S. 1399-1408.
- Barbe, J. C.; de Revel, G.; Joyeux, A.; Bertrand, A.; Lonvaud-Funel, A. (2001): Role of botrytized grape micro-organisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology* 90 (1), S. 34-42.

- Barbe, J. C.; de Revel, G.; Joyeux, A.; Lonvaud-Funel, A.; Bertrand, A. (2000): Role of carbonyl compounds in SO<sub>2</sub> binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (8), S. 3413-3419.
- Barrett-Connor, E. (2003): Diabetes and heart disease. *Diabetes Care* 26 (10), S. 2947-2958.
- Batthey, A. S.; Schaffner, D. W. (2001): Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Applied Microbiology* 91 (2), S. 237-247.
- Battling, S.; Wohlers, K.; Igwe, C.; Kranz, A.; Pesch, M.; Wirtz, A.; Baumgart, M.; Büchs, J.; Bott, M. (2020): Novel plasmid-free *Gluconobacter oxydans* strains for production of the natural sweetener 5-ketofructose. *Microbial Cell Factories* 19 (1), S. 1-15.
- Bechtluft, P.; Van Leeuwen, R. G.; Tyreman, M.; Tomkiewicz, D.; Nouwen, N.; Tepper, H. L.; Driessen, A. J. M.; Tans, S. J. (2007): Direct observation of chaperone-induced changes in a protein folding pathway. *Science* 318 (5855), S. 1458-1461.
- Belpoggi, F.; Soffritti, M.; Padovani, M.; Esposti, D. D.; Lauriola, M.; Minardi, F. (2006): Results of long-term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1076 (1), S. 559-577.
- Berks, B. C. (1996): A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular Microbiology* 22 (3), S. 393-404.
- Berks, B. C.; Palmer, T.; Sargent, F. (2003): The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Advances in Microbial Physiology* 47, S. 187-254.
- Berks, B. C.; Palmer, T.; Sargent, F. (2005): Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Current Opinion in Microbiology* 8 (2), S. 174-181.
- Berks, B. C.; Sargent, F.; Palmer, T. (2002): The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology* 35 (2), S. 260-274.
- Berry, C.; Brusick, D.; Cohen, S. M.; Hardisty, J. F.; Grotz, V. L.; Williams, G. M. (2016): Sucralose non-carcinogenicity: a review of the scientific and regulatory rationale. *Nutrition and Cancer* 68 (8), S. 1247-1261
- Bhosale, S. H.; Rao, M. B.; Deshpande, V. V. (1996): Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews* 60 (2), S. 280-300.
- Bian, X.; Tu, P.; Chi, L.; Gao, B.; Ru, H.; Lu, K. (2017): Saccharin induced liver inflammation in mice by altering the gut microbiota and its metabolic functions. *Food and Chemical Toxicology* 107, S. 530-539.
- Bianchini, F.; Kaaks, R.; Vainio, H. (2002): Overweight, obesity, and cancer risk. *The Lancet Oncology* 3 (9), S. 565-574.
- Binet, R.; Létoffé, S.; Ghigo, J. M.; Delepelaire, P.; Wandersman, C. (1997): Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene* 192 (1), S. 7-11.
- Blasi, M.; Barbe, J. C.; Dubourdieu, D.; Deleuze, H. (2008): New method for reducing the binding power of sweet white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (18), S. 8470-8474.
- Blatch, G. L.; Woods, D. (1993): Molecular characterization of a fructanase produced by *Bacteroides fragilis* BF-1. *Journal of Bacteriology* 175 (10), S. 3058-3066.

- Blaut, M.; Clavel, T. (2007): Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of Nutrition* 137 (3), S. 751-755.
- Blight, M. A.; Chervaux, C.; Holland, I. B. (1994): Protein secretion pathways in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 5 (5), S. 468-474.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2), S. 93-99.
- Blum, K.; Thanos, P. K.; Gold, M. S. (2014): Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. *Frontiers in Psychology* 5, S. 919.
- Bollella, P.; Hibino, Y.; Kano, K.; Gorton, L.; Antiochia, R. (2018): The influence of pH and divalent/monovalent cations on the internal electron transfer (IET), enzymatic activity, and structure of fructose dehydrogenase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (14), S. 3253-3264.
- Bosch, D.; De Boer, P.; Bitter, W.; Tommassen, J. (1989): The role of the positively charged N-terminus of the signal sequence of *E. coli* outer membrane protein PhoE in export. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 979 (1), S. 69-76.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248-254.
- Brandle, J. E.; Starratt, A. N.; Gijzen, M. (1998): *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science* 78 (4), S. 527-536.
- Brockmeier, U.; Caspers, M.; Freudl, R.; Jockwer, A.; Noll, T.; Eggert, T. (2006): Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *Journal of Molecular Biology* 362 (3), S. 393-402.
- Brownell, K. D.; Farley, T.; Willett, W. C.; Popkin, B. M.; Chaloupka, F. J.; Thompson, J. W.; Ludwig, D. S. (2009): The public health and economic benefits of taxing sugar-sweetened beverages. *The New England Journal of Medicine* 361 (16), S. 1599.
- Brundage, L.; Hendrick, J. P.; Schiebel, E.; Driessen, A. J.; Wickner, W. (1990): The purified *E. coli* integral membrane protein SecYE is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62 (4), S. 649-657.
- Brüser, T.; Sanders, C. (2003): An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological Research* 158 (1), S. 7-17.
- Buchert, J.; Viikari, L. (1988): Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (4), S. 375-379.
- Burroughs, L. F.; Sparks, A. H. (1973): Sulphite-binding power of wines and ciders. I. Equilibrium constants for the dissociation of carbonyl bisulphite compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24 (2), S. 187-198.
- Burt, B. A.; Pai, S. (2001): Sugar consumption and caries risk: a systematic review. *Journal of Dental Education* 65 (10), S. 1017-1023
- Büttner, D.; Bonas, U. (2002): Port of entry—the type III secretion translocon. *Trends in Microbiology* 10 (4), S. 186-192.
- Byun, B. Y.; Lee, S. J.; Mah, J. H. (2014): Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$ -2, 6-fructan), a multifunctional polysaccharide. *International Journal of Food Science & Technology* 49 (1), S. 238-245.

- Campbell, L. G. (2002): Sugar beet quality improvement. *Journal of Crop Production* 5 (1-2), S. 395-413.
- Cao, T. B.; Saier M. H. (2003): The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1609 (1), S. 115-125.
- Cardello, H. M. A. B.; Da Silva, M. A. P. A.; Damasio, M. H. (1999): Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. *Plant Foods for Human Nutrition* 54 (2), S. 119-129.
- Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. (2017): Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology* 107, S. 302-317.
- Casadaban, M. J. (1976): Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology* 104 (3), S. 541-555.
- Cascales, E.; Bernadac, A.; Gavioli, M.; Lazzaroni, J. C.; Lloubes, R. (2002): Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *Journal of Bacteriology* 184 (3), S. 754-759.
- Chaddock, A. M.; Mant, A.; Karnauchov, I.; Brink, S.; Herrmann, R. G.; Klösgen, R. B.; Robinson, C. (1995): A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *The EMBO Journal* 14 (12), S. 2715-2722.
- Chambert, R.; Treboul, G.; Dedonder, R. (1974): Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 41 (2), S. 285-300.
- Chapla, D.; Pandit, P.; Shah, A. (2012): Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology* 115, S. 215-221.
- Chattopadhyay, S.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R. (2014): Artificial sweeteners - a review. *Journal of Food Science and Technology* 51 (4), S. 611-621.
- Chen, M.; Whistler, R. L. (1977): Metabolism of D-fructose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 34, S. 285-343.
- Choi, J. H.; Lee, S. Y. (2004): Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (5), S. 625-635.
- Chou, M. M.; Kendall, D. A. (1990): Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *Journal of Biological Chemistry* 265 (5), S. 2873-2880.
- Côté, G. L.; Holt, S. M.; Miller-Fosmore, C. (2003): Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions. *ACS Symposium Series* 849 (7), S. 76-89.
- Cryan, J. F.; Dinan, T. G. (2012): Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 13 (10), S. 701-712.
- Dalbey, R. E.; von Heijne, G. (1992): Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes-a new protease family. *Trends in Biochemical Sciences* 17 (11), S. 474-478.

- Danno, G. I. (1970): Studies on D-Glucose-isomerizing Enzyme from *Bacillus coagulans*, Strain HN-68: Part IV Purification, Crystallization and Some Physicochemical Properties; Part V Comparative Study on the Three Activities of d-Glucose, d-Xylose and d-Ribose Isomerization of the Crystalline Enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry* 34 (12), S. 1795-1814.
- De Boer, H. A.; Comstock, L. J.; Vasser, M. (1983): The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (1), S. 21-25.
- De Keersmaecker, S.; Vrancken, K.; Van Mellaert, L.; Lammertyn, E.; Anné, J.; Geukens, N. (2006): Evaluation of TatABC overproduction on Tat- and Sec-dependent protein secretion in *Streptomyces lividans*. *Archives of Microbiology* 186 (6), S. 507-512.
- De Leeuw, E.; Granjon, T.; Porcelli, I.; Alami, M.; Carr, S. B.; Müller, M.; Sargent, F.; Palmer, T.; Berks, B. C. (2002): Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. *Journal of Molecular Biology* 322 (5), S. 1135-1146.
- De Ley, J.; Gillis, M.; Swings, J. (1984): The genus *Gluconobacter*. Krieg, N.R.; Holt, J. G. (Ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. 1. Baltimore, The Williams and Wilkins Co, S. 267-278.
- De Muynck, C.; Pereira, C. S.; Naessens, M.; Parmentier, S.; Soetaert, W.; Vandamme, E. J. (2007): The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (3), S. 147-171.
- Dedonder, R. (1966): Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology* 8, S. 500-505.
- Deppenmeier, U.; Ehrenreich, A. (2009): Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3), S. 233-242.
- Dilks, K.; Rose, R. W.; Hartmann, E.; Pohlschröder, M. (2003): Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *Journal of Bacteriology* 185 (4), S. 1478-1483.
- Doney, D. L.; Wyse, R. E.; Theurer, J. C. (1981): The relationship between cell size, yield, and sucrose concentration of the sugarbeet root. *Canadian Journal of Plant Science* 61(2), S. 447-453.
- Driessen, A. J. (2001): SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends in Microbiology* 9 (5), S. 193-196.
- Driessen, A. J.; Nouwen, N. (2008): Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual Review of Biochemistry* 77, S. 643-667.
- Du Plessis, D. J.; Nouwen, N.; Driessen, A. J. (2011): The sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808 (3), S. 851-865.
- DuBois, G. E.; Prakash, I. (2012): Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annual Review of Food Science and Technology* 3, S. 353-380.
- Duong, F.; Wickner, W. (1997): Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *The EMBO Journal* 16 (10), S. 2756-2768.
- El-serag, H. B.; Tran, T.; Everhart, J. E. (2004): Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 126 (2), S. 460-468.

- Emr, S. D.; Silhavy, T. J. (1983): Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (15), S. 4599-4603.
- Englard, S.; Avigad, G. (1965): 5-keto-D-fructose II. Patterns of formation and of associated dehydrogenase activities in *Gluconobacter cerinus*. *Journal of Biological Chemistry* 240 (6), S. 2297-2310.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta* 279 (2), S. 229-233.
- Englesberg, E. (1961): Enzymatic characterization of 17 L-arabinose negative mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 81 (6), S. 996-1006.
- Englesberg, E.; Anderson, R. L.; Weinberg, R.; Lee, N.; Hoffee, P.; Huttenhauer, G.; Boyer, H. (1962): L-Arabinose-sensitive, L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 84 (1), S. 137-146.
- Esawy, M. A.; Ahmed, E. F.; Helmy, W. A.; Mansour, N. M.; El-Senousy, W. M.; El-Safty, M. M. (2011): Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate Polymers* 86 (2), S. 823-830.
- Espinoza, M. I.; Vincken, J. P.; Sanders, M.; Castro, C.; Stieger, M.; Agosin, E. (2014): Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed *Stevia rebaudiana* commercial extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (49), S. 11797-11804.
- Fatima, B.; Hussain, Z. (2015): Xylose isomerases from thermotogales. *The Journal of Animal & Plant Science* 25 (1), S. 10-18.
- Fekkes, P.; Driessen, A. J. (1999): Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1), S. 161-173.
- Fewster, J. A. (1958): Growth of *Acetobacter suboxydans* and the oxidation of aldoses, related carboxylic acids, and aldehydes. *Biochemical Journal* 69 (4), S. 582-595.
- Filloux, A. (2004): The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1694 (1-3), S. 163-179.
- Flint, H. J.; Duncan, S. H.; Scott, K. P.; Louis, P. (2015): Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society* 74 (1), S. 13-22.
- Florea, M.; Hagemann, H.; Santosa, G.; Abbott, J.; Micklem, C. N.; Spencer-Milnes, X.; Garcia, L.; Paschou, D.; Lazenbatt, C.; Kong, D.; Chughtai, H.; Jensen, K.; Freemont, P. S.; Kitney, R.; Reeve, B.; Ellis, T. (2016): Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (24), S. 3431-3440.
- Fortuna, J. L. (2012): The obesity epidemic and food addiction. Clinical similarities to drug dependence. *Journal of Psychoactive Drugs* 44 (1), S. 56-63.
- Franke, T.; Deppenmeier, U. (2018): Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular Microbiology* 109 (4), S. 528-540.
- Fricke, P. M.; Link, T.; Gätgens, J.; Sonntag, C.; Otto, M.; Bott, M.; Polen, T. (2020): A tunable L-arabinose-inducible expression plasmid for the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (21), S. 9267-9282.

- Fujita, K.; Hara, K.; Hashimoto, H.; Kitahata, S. (1990a): Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (4), S. 913-919.
- Fujita, K.; Hara, K.; Hashimoto, H.; Kitahata, S. (1990b): Transfructosylation catalyzed by  $\beta$ -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (10), S. 2655-2661.
- Fung, T. T.; Malik, V.; Rexrode, K. M.; Manson, J. E.; Willett, W. C.; Hu, F. B. (2009): Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (4), S. 1037-1042.
- Gaily, M. H.; Elhassan, B. M.; Abasaeed, A. E.; Al-Shrhan, M. (2010): Isomerization and kinetics of glucose into fructose. *International Journal of Engineering & Technology* 10 (3), S. 1-6.
- Galán, J. E.; Collmer, A. (1999): Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284 (5418), S. 1322-1328.
- Gao, J.; Brennan, M. A.; Mason, S. L.; Brennan, C. S. (2016): Effect of sugar replacement with stevianna and inulin on the texture and predictive glycaemic response of muffins. *International Journal of Food Science & Technology* 51 (9), S. 1979-1987.
- Gascón, S.; Neumann, N. P.; Lampen, J. O. (1968): Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 243 (7), S. 1573-1577.
- George, V.; Arora, S.; Wadhwa, B. K.; Singh, A. K. (2010): Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates. *Journal of Food Science and Technology* 47 (4), S. 408-413.
- Georgiou, G.; Valax, P. (1996): Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 7 (2), S. 190-197.
- Ghosh, S.; Sudha, M. L. (2012): A review on polyols: new frontiers for health-based bakery products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63 (3), S. 372-379.
- Giaquinta, R. T. (1979): Sucrose translocation and storage in the sugar beet. *Plant Physiology* 63 (5), S. 828-832.
- Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K. (2017): Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14 (8), S. 491-502.
- Gierasch, L. M. (1989): Signal sequences. *Biochemistry* 28 (3), S. 923-930.
- González, C.; Tapia, M.; Pérez, E.; Pallet, D.; Dornier, M. (2014): Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review. *Fruits* 69 (2), S. 127-141.
- Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Research* 38 (2), S. 695-699.
- Grembecka, M. (2015): Sugar alcohols – their role in the modern world of sweeteners. A review. *European Food Research and Technology* 241 (1), S. 1-14.

- Gross, D.; Blanchard, P. H.; Bell, D. J. (1954): Neo Kestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, S. 1727-1730.
- Gross, R.; Simon, J.; Kröger, A. (2001): Periplasmic methacrylate reductase activity in *Wolinella succinogenes*. *Archives of Microbiology* 176 (4), S. 310-313.
- Grotz, V. L.; Munro, I. C. (2009): An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55 (1), S. 1-5.
- Gullo, M.; Caggia, C.; De Vero, L.; Giudici, P. (2006): Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *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. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3 (3), S. 445-456.
- Guy, M. J.; Deren, J. J. (1971): Selective permeability of the small intestine for fructose. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 221 (4), S. 1051-1056.
- Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J.; Beckwith, J. O. N. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* 177 (14), S. 4121-4130.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4), S. 557-580.
- Hancock, R. D. (2009): Recent patents on vitamin C: opportunities for crop improvement and singlestep biological manufacture. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 1 (1), S. 39-49.
- Hanke, T.; Nii, K.; Noack, S.; Polen, T.; Bringer, S.; Sahm, H.; Wiechert, W.; Bott, M. (2013): Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (7), S. 2336-2348.
- Hannig, G.; Makrides, S. C. (1998): Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 16 (2), S. 54-60.
- Hanover, L. M.; White, J. S. (1993): Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition* 58 (5), S. 724-732.
- Harris, J. M.; Epting, K. L.; Kelly, R. M. (2010): N-terminal fusion of a hyperthermophilic chitin-binding domain to xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana* enhances kinetics and thermostability of both free and immobilized enzymes. *Biotechnology Progress* 26 (4), S. 993-1000.
- Hatch, M. D.; Slack, C. R. (1966): Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal* 101 (1), S. 103-111.
- Heggeset, T. M. B.; Kucharova, V.; Nærdal, 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*. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (2), S. 559-568.
- Heinen, A. W.; Peters, J. A.; van Bekkum, H. (1997): The oxidation of fructose on Pt/C catalysts. The formation of D-threo-hexo-2,5-diulose and the effect of additives. *Carbohydrate Research* 304 (2), S. 155-164.
- Heinz, F.; Lamprecht, W.; Kirsch, J. (1968): Enzymes of fructose metabolism in human liver. *The Journal of Clinical Investigation* 47 (8), S. 1826-1832.

- Hellfritsch, C.; Brockhoff, A.; Stähler, F.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. (2012): Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (27), S. 6782-6793.
- Hemmerich, J.; Rohe, P.; Kleine, B.; Jurischka, S.; Wiechert, W.; Freudl, R.; Oldiges, M. (2016): Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories* 15 (208), S. 1-11.
- Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Nataro, J. P. (1998): The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* 6 (9), S. 370–378.
- Henriksen, C. M.; Nilsson, D.; Hansen, S.; Johansen, E. (1999): Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. *International Dairy Journal* 9 (1), 17-23.
- Herweg, E.; Schöpping, M.; Rohr, K.; Siemen, A.; Frank, O.; Hofmann, T.; Deppenmeier, U.; Büchs, J. (2018): Production of the potential sweetener 5-ketofructose from fructose in fed-batch cultivation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology* 259, S. 64-72
- Ho, C. W.; Aida, W. W.; Maskat, M. Y.; Osman, H. (2007): Changes in volatile compounds of palm sap (*Arenga pinnata*) during the heating process for production of palm sugar. *Food Chemistry* 102 (4), S. 1156-1162.
- Hoffmann, J. J.; Hövels, M.; Kosciow, K.; Deppenmeier, U. (2020): Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *Journal of Biotechnology* 307, S. 164-174.
- Holland, I. B.; Schmitt, L.; Young, J. (2005): Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Molecular Membrane Biology* 22 (1-2), S. 29-39.
- Hölscher, T.; Weinert-Sepalage, D.; Gorisch, H. (2007): Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* 153 (2), S. 499-506.
- Hossain, A.; Yamaguchi, F.; Matsuo, T.; Tsukamoto, I.; Toyoda, Y.; Ogawa, M.; Nagata, Y.; Tokuda, M. (2015): Rare sugar D-allulose: Potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacology & Therapeutics* 155, S. 49-59.
- Hou, B.; Brüser, T. (2011): The Tat-dependent protein translocation pathway. *Biomolecular Concepts* 2 (6), S. 507-523.
- Hövels, M.; Kosciow, K.; Kniewel, J.; Jakob, F.; Deppenmeier, U. (2020): High yield production of levan-type fructans by *Gluconobacter japonicus* LMG 1417. *International Journal of Biological Macromolecules* 164, S. 295-303.
- Hu, F. B.; Malik, V. S. (2010): Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiology & Behavior* 100 (1), S. 47-54.
- Hueck, C. J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2), S. 379-433.
- Huwig, A.; Danneel, H. J.; Giffhorn, F. (1994): Laboratory procedures for producing 2-Keto-D-Glucose, 2-Keto-D-Xylose and 5-Keto-D-Fructose from D-Glucose, D-Xylose and L-Sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea*. *Journal of Biotechnology* 32 (3), S. 309-315.

- Hyvönen, L.; Koivistoinen, P.; Voirol, F. (1982): Food technological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research* 28, S. 373-403.
- Ikeda, T.; Matsushita, F.; Senda, M. (1990): D-Fructose Dehydrogenase-modified Carbon Paste Electrode Containing p-Benzoquinone as a Mediated Amperometric Fructose Sensor. *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (11), S. 2919–2924.
- Imperi, F.; Ciccocanti, F.; Perdomo, A. B.; Tiburzi, F.; Mancone, C.; Alonzi, T.; Ascenzi, P.; Visca, P.; Fimia, G. M. (2009): Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics* 9 (7), S. 1901-1915.
- İspirli, H.; Kaya, Y.; Dertli, E. (2020): Bifidogenic effect and in vitro immunomodulatory roles of melibiose-derived oligosaccharides produced by the acceptor reaction of glucansucrase E81. *Process Biochemistry* 91, S. 126-131.
- Izumori, K. (2002): Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften* 89 (3), S. 120-124.
- Jakob, F.; Meißner, D.; Vogel, R. F. (2012): Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species. *Acetic Acid Bacteria* 1 (1), S. 6-14.
- Jakob, F.; Quintero, Y.; Musacchio, A.; Estrada-de los Santos, P.; Hernández, L.; Vogel, R. F. (2019): Acetic acid bacteria encode two levansucrase types of different ecological relationship. *Environmental Microbiology* 21 (11), S. 4151-4165.
- Janer, C.; Rohr, L. M.; Peláez, C.; Laloï, M.; Cleusix, V.; Requena, T.; Meile, L. (2004): Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Systematic and Applied Microbiology* 27 (3), S. 279-285.
- Jensen, V. J.; Rugh, S. (1987): [33] Industrial-scale production and application of immobilized glucose isomerase. *Methods in Enzymology* 163, S. 356–370.
- Jia, D. X.; Zhou, L.; Zheng, Y. G. (2017): Properties of a novel thermostable glucose isomerase mined from *Thermus oshimai* and its application to preparation of high fructose corn syrup. *Enzyme and Microbial Technology* 99, S. 1-8.
- Jin, L. Q.; Xu, Q.; Liu, Z. Q.; Jia, D. X.; Liao, C. J.; Chen, D. S.; Zheng, Y. G. (2017): Immobilization of recombinant glucose isomerase for efficient production of high fructose corn syrup. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 183 (1), S. 293-306.
- Joo, G. J.; Shin, J. H.; Heo, G. Y.; Kim, Y. M.; Rhee, I. K. (2005): Molecular cloning and expression of a thermostable xylose (glucose) isomerase gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59. *The Journal of Microbiology* 43 (1), S. 34-37.
- Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. (2004): A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology* 338 (5), S. 1027-1036.
- Kallnik, V.; Meyer, M.; Deppenmeier, U.; Schweiger, P. (2010): Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Biotechnology* 150 (4), S. 460-465.
- Karaoglu, H.; Yanmis, D.; Sal, F. A.; Celik, A.; Canakci, S.; Belduz, A. O. (2013): Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2T that displays a high level of activity and thermal stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97, S. 215-224.
- Kawai, S.; Goda-Tsutsumi, M.; Yakushi, T.; Kano, K.; Matsushita, K. (2013): Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome c complex fructose

dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5), S. 1654-1660.

Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10 (6), S. 845-858.

Kelly, G. (2008): Inulin-type prebiotics-a review: part 1. *Alternative Medicine Review* 13 (4), S. 315-329.

Kenchiah, S.; Evans, J. C.; Levy, D.; Wilson, P. W.; Benjamin, E. J.; Larson, M. G. Kannel, W. B.; Vasan, R. S. (2002): Obesity and the risk of heart failure. *New England Journal of Medicine* 347 (5), S. 305-313.

Kikkert, A.; Vellenga, K.; De Wilt, H. G. J.; Joosten, G. E. H. (1981): The isomerization of D-glucose into D-fructose catalyzed by whole-cell immobilized glucose isomerase. The dependence of the intrinsic rate of reaction on substrate concentration, pH, and temperature. *Biotechnology and Bioengineering* 23 (5), S. 1087-1101.

Kirkland, D.; Gatehouse, D. (2015): Aspartame: A review of genotoxicity data. *Food and Chemical Toxicology* 84, S. 161-168.

Klasen, R.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1995): Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate: NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology* 177 (10), S. 2637-2643.

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*. *Journal of Industrial Microbiology and 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. *Journal of Biotechnology* 189, S. 27-35.

Kostner, D.; Peters, B.; Mientus, M.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013): Importance of codB for new codA-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (18), S. 8341-8349.

Kotwal, S. M.; Shankar, V. (2009): Immobilized invertase. *Biotechnology Advances* 27 (4), S. 311-322.

Kovach, M. E.; Elzer, P. H.; Hill, D. S.; Robertson, G. T.; Farris, M. A.; Roop II, R. M.; Peterson, K. M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166 (1), S. 175-176.

Krajewski, V.; Simić, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13), S. 4369-4376.

Kroyer, G. (2010): Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5 (2), S. 225-229

Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Hofmann, T.; Frank, O.; Behrens, M.; Lewtschenko, T.; Slack, J. P.; Ward, C. D.; Meyerhof, W. (2004): Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *Journal of Neuroscience* 24 (45), S. 10260-10265.

- Kulhánek, M. (1989): Microbial dehydrogenations of monosaccharides. *Advances in Applied Microbiology* 34, S. 141-182.
- Kulp, K. (1975): Carbohydrases. *Enzymes in Food Processing* 2, S. 62-87.
- Kunst, F.; Steinmetz, M.; Lepesant, J. A.; Dedonder, R. (1977): Presence of a third sucrose-hydrolyzing enzyme in *Bacillus subtilis*: constitutive levanase synthesis by mutans of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Biochimie* 59 (3), S. 287-292.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680-685.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21), S. 2947-2948.
- 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. *FEMS Microbiology Letters* 177 (2), S. 191-197.
- Lee, G. C.; Lin, C. H.; Tao, Y. C.; Yang, J. M.; Hsu, K. C.; Huang, Y. J.; Huang, S. H.; Kung, P. J.; Chen, W. L.; Wang, C. M.; Wu, Y. R.; Chen, C. M.; Lin, J. Y.; Hsieh-Li, H. M.; Lee-Chen, G. J. (2015): The potential of lactulose and melibiose, two novel trehalase-indigestible and autophagy-inducing disaccharides, for polyQ-mediated neurodegenerative disease treatment. *Neurotoxicology* 48, S. 120-130.
- Lee, N.; Francklyn, C.; Hamilton, E. P. (1987): Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (24), S. 8814-8818.
- Lee, P. A.; Tullman-Ercek, D.; Georgiou, G. (2006): The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annual Review of Microbiology* 60, S. 373-395.
- Lee, S. C.; Olins, P. O. (1992): Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 267 (5), S. 2849-2852.
- Lee, V. T.; Schneewind, O. (1999): Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu. *Molecular Microbiology* 31 (6), S. 1619-1629.
- Lehnhardt, S.; Pollitt, N. S.; Goldstein, J.; Inouye, M. (1988): Modulation of the effects of mutations in the basic region of the OmpA signal peptide by the mature portion of the protein. *Journal of Biological Chemistry* 263 (21), S. 10300-10303.
- Levin, G. V. (2002): Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *Journal of Medicinal Food* 5 (1), S. 23-36.
- Li, Y.; Triccas, J. A.; Ferenci, T. (1997): A novel levansucrase–levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1353 (3), S. 203-208.
- Liebl, W.; Brem, D.; Gotschlich, A. (1998): Analysis of the gene for  $\beta$ -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1), S. 55-64.
- Lima, D. M.; Fernandes, P.; Nascimento, D. S.; Ribeiro, R. L. F.; de Assis, S. A. (2011): Fructose syrup: a biotechnology asset. *Food Technology and Biotechnology* 49 (4), S. 424-434.

- Lin, C.-H.; Wu, Y.-R.; Yang, J.-M.; Chen, W.-L.; Chao, C.-Y.; Chen, I.-C.; Lin, T.-H.; Wu, Y.-C.; Hsu, K.-C.; Chen, C.-M.; Lee, G.-C.; Hsieh-Li, H.-M.; Lee, C.-M.; Lee-Chen, G.-J. (2016): Novel lactulose and melibiose targeting autophagy to reduce PolyQ aggregation in cell models of spinocerebellar ataxia 3. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 15 (3), S. 351–359.
- Lincoln, L.; More, S. S. (2017): Bacterial invertases: occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. *Journal of Basic Microbiology* 57 (10), S. 803-813.
- Liu, J.; Luo, J.; Ye, H.; Zeng, X. (2012): Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food and Chemical Toxicology* 50 (3-4), S. 767-772.
- Liu, Z. Q.; Zheng, W.; Huang, J. F.; Jin, L. Q.; Jia, D. X.; Zhou, H. Y.; Xu, J.-M.; Liao, C.-J.; Cheng, X.-P.; Mao, B. X.; Zheng, Y. G. (2015): Improvement and characterization of a hyperthermophilic glucose isomerase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* and its application in production of high fructose corn syrup. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42 (8), S. 1091-1103.
- Livesey, G.; Taylor, R. (2008): Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: meta-analyses and meta-regression models of intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88 (5), S. 1419-1437.
- Llamas, M. A.; Ramos, J. L.; Rodríguez-Herva, J. J. (2000): Mutations in Each of the tol Genes of *Pseudomonas putida* Reveal that They Are Critical for Maintenance of Outer Membrane Stability. *Journal of Bacteriology* 182 (17), S. 4764-4772.
- Lo Sciuto, A.; Fernández-Piñar, R.; Bertuccini, L.; Iosi, F.; Superti, F.; Imperi, F. (2014): The periplasmic protein TolB as a potential drug target in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one* 9 (8).
- Lobell, R. B.; Schleif, R. F. (1990): DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* 250 (4980), S. 528-532.
- Longley, R. P.; Perlman, D. (1972): Conversion of L-sorbose to 5-keto-D-fructose by *Pseudomonads*. *Biotechnology and Bioengineering* 14 (5), S. 843-846.
- Lönn, A.; Gárdonyi, M.; van Zyl, W.; Hahn-Hägerdal, B.; Otero, R. C. (2002): Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis: Gene cloning and protein characterization. *European Journal of Biochemistry* 269 (1), S. 157-163.
- Luirink, J.; Hagen-Jongman, C. M.; van der Weijden, C. C.; Oudega, B.; High, S.; Dobberstein, B.; Kusters, R. (1994): An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *The EMBO Journal* 13 (10), S. 2289-2296.
- Lyness, E. W.; Doelle, H. W. (1983): Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 5 (5), S. 345-350.
- MacDonald, I. A. (2016): A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes. *European Journal of Nutrition* 55 (2), S. 17-23.
- Malik, V. S.; Hu, F. B. (2012): Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: the role of sugar-sweetened beverages. *Current Diabetes Reports* 12 (2), S. 195-203.
- Malik, V. S.; Popkin, B. M.; Bray, G. A.; Després, J. P.; Hu, F. B. (2010): Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 121 (11), S. 1356-1364.

- Malik, V. S.; Schulze, M. B.; Hu, F. B. (2006): Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 84 (2), S. 274-288.
- 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. *Journal of the American Dental Association* 138 (1), S. 39-46.
- Martin, I.; Débarbouillé, M.; Ferrari, E.; Klier, A.; Rapoport, G. (1987): Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Molecular and General Genetics MGG* 208 (1-2), S. 177-184.
- Matsumoto, K.; Hamada, O.; Ukeda, H.; Osajima, Y. (1986): Amperometric flow injection determination of fructose with an immobilized fructose 5-dehydrogenase reactor. *Analytical Chemistry* 58 (13), S. 2732-2734.
- Matsushita, K.; Fujii, Y.; Ano, Y.; Toyama, H.; Shinjoh, M.; Tomiyama, N.; Miyazaki, T.; Sugisawa, T.; Hoshino, T.; Adachi, O. (2003): 5-Keto-d-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter species*. *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. *Agricultural and Biological Chemistry* 44 (7), S. 1505-1512.
- Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. (1994): Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 36, 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. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (1), S. 1-14.
- Mendoza, M. R.; Olano, A.; Villamiel, M. (2005): Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (8), S. 2995-2999.
- Menéndez, C.; Hernández, L.; Selman, G.; Mendoza, M. F.; Hevia, P.; Sotolongo, M.; Arrieta, J. G. (2002): Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Current Microbiology* 45 (1), S. 5-12.
- Mergulhao, F. J. M.; Monteiro, G. A. (2004): Secretion capacity limitations of the Sec pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (1), S. 128-133.
- Mergulhao, F. J. M.; Summers, David K.; Monteiro, G. A. (2005): Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* 23 (3), S. 177-202.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (8), S. 3189-3200.
- Miller, J. H. (1972): Assay of  $\beta$ -galactosidase. *Experiments in molecular genetics*, S. 352-355.
- Montonen, J.; Jarvinen, R.; Knekt, P.; Heliovaara, M.; Reunanen, A. (2007): Consumption of sweetened beverages and intakes of fructose and glucose predict type 2 diabetes occurrence. *The Journal of Nutrition* 137 (6), S. 1447-1454.
- Mooradian, A. D.; Smith, M.; Tokuda, M. (2017): The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical nutrition eSPen* 18, S. 1-8.

- Moreno, F.; Fowler, A. V.; Hall, M.; Silhavy, T. J.; Zabin, I.; Schwartz, M. (1980): A signal sequence is not sufficient to lead  $\beta$ -galactosidase out of the cytoplasm. *Nature* 286 (5771), S. 356-359.
- Mori, H.; Cline, K. (2002): A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat translocase. *The Journal of Cell Biology* 157 (2), S. 205-210.
- Mostafa, H. E.; Heller, K. J.; Geis, A. (2002): Cloning of *Escherichia coli* lacZ and lacY genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5), S. 2619-2623.
- Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. (2006): Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 41 (9), S. 1913-1923.
- Mowshowitz, S.; Avigad, G.; Englard, S. (1974a): 5-Keto-d-Fructose: Formation and Utilization in the Course of d-Fructose Assimilation by *Gluconobacter cerinus*. *Journal of Bacteriology* 118 (3), S. 1051-1058.
- Mowshowitz, S.; Englard, S.; Avigad, G. (1974b): Metabolic Consequences of a Block in the Synthesis of 5-Keto-d-Fructose in a Mutant of *Gluconobacter cerinus*. *Journal of Bacteriology* 119 (2), S. 363-370.
- Mu, W.; Zhang, W.; Feng, Y.; Jiang, B.; Zhou, L. (2012): Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94 (6), S. 1461-1467.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R. K.; Horn, G. T.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, S. 263-273.
- Munro, I. C.; Bernt, W. O.; Borzelleca, J. F.; Flamm, G.; Lynch, B. S.; Kennepohl, E.; Bär, E.A.; Modderman, J. (1998): Erythritol: an interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data. *Food and Chemical Toxicology* 36 (12), S. 1139-1174.
- Muramatsu, K.; Onodera, S.; Kikuchi, M.; Shiomi, N. (1994): Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57 (10), S. 1681-1685.
- Murata, K.; Suzuki, M.; Nakamura, N.; Ohno, H. (2009): Direct evidence of electron flow via the heme c group for the direct electron transfer reaction of fructose dehydrogenase using 177 a silver nanoparticle-modified electrode. *Electrochemistry Communications* 11 (8), S. 1623–1626.
- Murray, S.; Tulloch, A.; Criscitelli, K.; Avena, N. M. (2016): Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: relevance to low calorie sweeteners. *Physiology & Behavior* 164, S. 504-508.
- Nadeem, H.; Rashid, M. H.; Siddique, M. H.; Azeem, F.; Muzammil, S.; Javed, M. R.; Ali, M. A.; Rasul, I.; Riaz, M. (2015): Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry* 50 (8), S. 1202-1210.
- Natale, P.; Brüser, T.; Driessen, A. J. (2008): Sec-and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778 (9), S. 1735-1756.
- Neuberg, C.; Roberts, I. S. (1946): Invertase. Scientific Report Series No. 4. *Sugar Research Foundation Inc. New York*.

- Neumann, N. P.; Lampen, J. O. (1967): Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry* 6 (2), S. 468-475.
- Ng, D. T.; Brown, J. D.; Walter, P. (1996): Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Cell Biology* 134 (2), S. 269-278.
- Nguyen, L.; Paulsen, I. T.; Tchieu, J.; Hueck, C. J.; Saier M. H. (2000): Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2 (2), S. 125-144.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Von Heijne, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering, Design and Selection* 10 (1), S. 1-6.
- Nielsen, S. J.; Popkin, B. M. (2004): Changes in beverage intake between 1977 and 2001. *American Journal of Preventive Medicine* 27 (3), S. 205-210.
- Normén, L.; Lærke, H. N.; Jensen, B. B.; Langkilde, A. M.; Andersson, H. (2001): Small-bowel absorption of D-tagatose and related effects on carbohydrate digestibility: an ileostomy study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (1), S. 105-110.
- Nout, M. R.; Rombouts, F. M. (2001): Fermented foods and their production. *Fermentation and Food Safety* 1, S. 1-19.
- Nuñez, P. A.; Soria, M.; Farber, M. D. (2012): The twin-arginine translocation pathway in  $\alpha$ -proteobacteria is functionally preserved irrespective of genomic and regulatory divergence. *PLoS One* 7 (3).
- Oh, D. K. (2007): Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (1), S. 1.
- Okasha, E. F. (2016): Effect of long term-administration of aspartame on the ultrastructure of sciatic nerve. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 4 (4), S. 175-183.
- Oku, T.; Okazaki, M. (1996): Laxative threshold of sugar alcohol erythritol in human subjects. *Nutrition Research* 16 (4), S. 577-589.
- Olijve, W.; Kok, J. J. (1979): Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Archives of Microbiology* 121 (3), S. 283-290.
- Olivares-Illana, V.; López-Munguía, A.; Olvera, C. (2003): Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology* 185 (12), S. 3606-3612.
- Omori, T.; Ueno, K.; Muramatsu, K.; Kikuchi, M.; Onodera, S.; Shiomi, N. (2010): Characterization of recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Chemistry Central Journal* 4 (1), S. 1-10.
- O'Mullan, P. J.; Chase, T.; Eveleigh, D. E. (1992): Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (3), S. 341-346.
- Öner, E. T.; Hernández, L.; Combie, J. (2016): Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances* 34 (5), S. 827-844.
- Ozimek, L. K.; Kralj, S.; Van der Maarel, M. J. E. C.; Dijkhuizen, L. (2006): The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non processive transglycosylation reactions. *Microbiology* 152 (4), S. 1187-1196.

- Panella, L. (2010): Sugar beet as an energy crop. *Sugar Tech* 12 (3-4), S. 288-293.
- Paolini, M.; Vivarelli, F.; Sapone, A.; Canistro, D. (2017): Aspartame, a bittersweet pill. *Carcinogenesis* 38 (12), S. 1249-1250.
- Parker, K.; Salas, M.; Nwosu, V. C. (2010): High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 5 (5), S. 71-78.
- Pepino, M. Y. (2015): Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiology & Behavior* 152, S. 450-455.
- Perezperez, J.; Martinez-Caja, C.; Barbero, J. L.; Gutierrez, J. (1995): DnaK/DnaJ supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 210 (2), S. 524-529.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (14), S. 6397-6412.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Von Heijne, G.; Nielsen, H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8 (10), S. 785-786.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004): UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25 (13), S. 1605-1612.
- Philippe, R. N.; De Mey, M.; Anderson, J.; Ajikumar, P. K. (2014): Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. *Current Opinion in Biotechnology* 26, S. 155-161.
- Placzek, S.; Schomburg, I.; Chang, A.; Jeske, L.; Ulbrich, M.; Tillack, J.; Schomburg, D. (2016): BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic acids research* 45 (1), S. 380-388.
- Porrás-Domínguez, J. R.; Ávila-Fernández, Á.; Rodríguez-Alegría, M. E.; Miranda-Molina, A.; Escalante, A.; González-Cervantes, R.; Olvera, C.; Munguía, A. L. (2014): Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry* 49 (5), S. 783-790.
- Preziosi, L.; Michel, G. P. F.; Baratti, J. (1990): Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrase and levansucrase activities. *Canadian Journal of Microbiology* 36 (3), S. 159-163.
- Prust, C.; Hoffmeister, M.; Liesegang, H.; Wiezer, A.; Fricke, W. F.; Ehrenreich, A.; Gottschalk, G.; Deppenmeier, U. (2005): Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology* 23 (2), S. 195-200.
- Pugsley, A. P.; Francetic, O.; Possot, O. M.; Sauvonnnet, N.; Hardie, K. R. (1997): Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria—a review. *Gene* 192 (1), S. 13-19.
- Pukatzki, S.; Ma, A. T.; Revel, A. T.; Sturtevant, D.; Mekalanos, J. J. (2007): Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (39), S. 15508-15513.
- Puziss, J. W.; Fikes, J. D.; Bassford, P. J. (1989): Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. *Journal of Bacteriology* 171 (5), S. 2303-2311.

- Rabenhorst, J.; Gattfield, I.; Hilmer, J. M. (2001): Natural, aliphatic and thiocarboxylic acids obtainable by fermentation and a microorganism therefore. *EP1078990*.
- Rajaeifar, M. A.; Hemayati, S. S.; Tabatabaei, M.; Aghbashlo, M.; Mahmoudi, S. B. (2019): A review on beet sugar industry with a focus on implementation of waste-to-energy strategy for power supply. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 103, S. 423-442.
- Rapoport, T. A. (1992): Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258 (5084), S. 931-936.
- Rauch, B.; Pahlke, J.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2010): Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (3), S. 711-718.
- Reichstein, T.; Grüssner, A. (1934): Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helvetica Chimica Acta* 17 (1), S. 311-328.
- Reinefeld, E.; Thielecke, K. (1984): Die Technologie des Zuckers. *Chemie in unserer Zeit* 18 (6), S. 181-190.
- Ricca, E.; Calabrò, V.; Curcio, S.; Iorio, G. (2007): The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (3), S. 129-145.
- Richards, E. L.; Chandrasekhara, M. R. (1960): Chemical changes in dried skim-milk during storage. *Journal of Dairy Research* 27 (1), S. 59-66.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (19), S. 6975-6986.
- Richhardt, J.; Bringer, S.; Bott, M. (2013): Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (10), S. 4315-4323.
- Roberfroid, M. B. (2001): Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2), S. 406-409.
- Rosenberg, H. F. (1998): Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. *Biotechniques* 24 (2), S. 188-192.
- Rozanov, A. S.; Zagrebely, S. N.; Beklemishev, A. B. (2009): Cloning of *Escherichia coli* K12 xylose isomerase (glucose isomerase) gene and studying the enzymatic properties of its expression product. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45 (1), S. 31-37.
- Runge, K. K.; Brossard, D.; Scheufele, D. A.; Rose, K. M.; Larson, B. J. (2017): Attitudes about food and food-related biotechnology. *Public Opinion Quarterly* 81 (2), S. 577-596.
- Russel, M. (1998): Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *Journal of Molecular Biology* 279 (3), S. 485-499.
- Rycerz, K.; Jaworska-Adamu, J. E. (2013): Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathologica* 51 (1), S. 10-17.
- Saad, N.; Delattre, C.; Urdaci, M.; Schmitter, J. M.; Bressollier, P. (2013): An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology* 50 (1), S. 1-16.
- Saier, M. H. (2006): Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *The Journal of Membrane Biology* 214 (1-2), S. 75-90.

- Saleh, A. A. S. (2014): Synergistic effect of N-acetyl cysteine and folic acid against aspartame-induced nephrotoxicity in rats. *International Journal of Advanced Research* 2 (5), S. 363-373.
- Samuel, P.; Ayoob, K. T.; Magnuson, B. A.; Wölwer-Rieck, U.; Jeppesen, P. B.; Rogers, P. J.; Rowland, I.; Mathews, R. (2018): Stevia leaf to stevia sweetener: exploring its science, benefits, and future potential. *The Journal of Nutrition* 148 (7), S. 1186S-1205S.
- Sargent, F.; Bogsch, E. G.; Stanley, N. R.; Wexler, M.; Robinson, C.; Berks, B. C.; Palmer, T. (1998): Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *The EMBO Journal* 17 (13), S. 3640-3650.
- Sargent, F.; Stanley, N. R.; Berks, B. C.; Palmer, T. (1999): Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli* A distinct and pivotal role for the TatB protein. *Journal of Biological Chemistry* 274 (51), S. 36073-36082.
- Sarwar, N.; Gao, P.; Seshasai, S. R.; Gobin, R.; Kaptoge, S.; Di Angelantonio, E.; Stehouwer, C. D. (2010): Emerging Risk Factors Collaboration: Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet* 375 (9733), S. 2215-2222.
- Sato, K.; Yamada, Y.; Aida, K.; Uemura, T. (1969): Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol. *Journal of Biochemistry* 66 (4), S. 521–527.
- Savita, S. M.; Sheela, K.; Sunanda, S.; Shankar, A. G.; Ramakrishna, P. (2004): *Stevia rebaudiana*—A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology* 15 (4), S. 261-264.
- Schatz, P.J.; Beckwith, J. (1990): Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* 24 (1), S. 215–248.
- Schedel, M. (2000): Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, key reaction in the industrial 1-deoxynojirimycin synthesis. *Biotechnology* 8, S. 295-308.
- Scheppach, W. (1994): Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 35 (1 Suppl), S 35-38.
- Schleif, R. (2010). AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (5), S. 779-796.
- Schneider, K.; Dorscheid, S.; Witte, K.; Giffhorn, F.; Heinzle, E. (2012): Controlled feeding of hydrogen peroxide as oxygen source improves production of 5- ketofructose from L-sorbose using engineered pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea*. *Biotechnology and Bioengineering* 109 (11), S. 2941-2945.
- Schrimsher, J. L.; Wingfield, P. T.; Bernard, A.; Mattaliano, R.; Payton, M. A. (1988): Purification and characterization of 5-ketofructose reductase from *Erwinia citreus*. *Biochemical Journal* 253 (2), S. 511-516.
- Schweiger, P.; Gross, H.; Deppenmeier, U. (2010): Characterization of two aldo–keto reductases from *Gluconobacter oxydans* 621H capable of regio- and stereoselective  $\alpha$ -ketocarbonyl reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (4), S. 1415-1426.
- Seiskari, P.; Linko, Y. Y.; Linko, P. (1985): Continuous production of gluconic acid by immobilized *Gluconobacter oxydans* cell bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21 (6), S. 356-360.

- Senthilkumar, V.; Rameshkumar, N.; Busby, S. J.W.; Gunasekaran, P. (2004): Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (*sacC*) improves levan production. *Journal of Applied Microbiology* 96 (4), S. 671-676.
- Shankar, P.; Ahuja, S.; Sriram, K. (2013): Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition* 29 (11-12), S. 1293-1299.
- 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*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73 (1), S. 241-244.
- Shiomi, N.; Abe, T.; Kikuchi, H.; Aritsuka, T.; Takata, Y.; Fukushi, E.; Fukushi, Y.; Kawabata, J.; Ueno, K.; Onodera, S. (2016): Structural analysis of novel kestose isomers isolated from sugar beet molasses. *Carbohydrate Research* 424, S. 1-7.
- Siemen, A. (2017): Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Oxidoreduktasen in *Gluconobacter oxydans* und Produktion des potentiellen Süßstoffes 5-Keto-D-Fruktose. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Siemen, A.; Kosciow, K.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2018): Production of 5-ketofructose from fructose or sucrose using genetically modified *Gluconobacter oxydans* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (4), S. 1699-1710.
- Simon, J.; Gross, R.; Ringel, M.; Schmidt, E.; Kröger, A. (1998): Deletion and site-directed mutagenesis of the *Wolinella succinogenes* fumarate reductase operon. *European Journal of Biochemistry* 251 (1-2), S. 418-426.
- Sims, A. L.; Windels, C. E.; Bradley, C. A. (2010): Content and potential availability of selected nutrients in field-applied sugar beet factory lime. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41 (4), S. 438-453.
- Sletta, H.; Tøndervik, A.; Hakvåg, S.; Aune, T. VeeE; Nedal, A.; Aune, R.; Evensen, G.; Valla, S.; Ellingsen, T. E.; Brautaset, T. (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 highcell-density cultivations of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3), S. 906-912.
- Smith, F.; Spriestersbach, D. (1954): The Separation of D-Glucose and D-Fructose from Invert Sugar or Sucrose. *Journal of the American Chemical Society* 76 (16), S. 4191-4192.
- Smith, R. A.; Duncan, M. J.; Moir, D. T. (1985): Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 229 (4719), S. 1219-1224.
- Soffritti, M.; Belpoggi, F.; Esposti, D. 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. *Environmental Health Perspectives* 114 (3), S. 379-385.
- Soffritti, M.; Belpoggi, F.; Manservigi, M.; Tibaldi, E.; Lauriola, M.; Falcioni, L.; Bua, L. (2010): Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. *American Journal of Industrial Medicine* 53 (12), S. 1197-1206.
- Soisson, S. M.; MacDougall-Shackleton, B.; Schleif, R.; Wolberger, C. (1997): Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science* 276 (5311), S. 421-425.
- Sommer, F.; Bäckhed, F. (2013): The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 11 (4), S. 227-238.

- Sørensen, H. P.; Mortensen, K. K. (2005): Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115 (2), S. 113-128.
- Stanhope, K. L. (2016): Sugar consumption, metabolic disease and obesity. The state of the controversy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 53 (1), S. 52-67.
- Staudigl, P.; Haltrich, D.; Peterbauer, C. K. (2014): L-Arabinose isomerase and D-xylose isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of D-galactose and D-glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (7), S. 1617-1624.
- Stone, H.; Oliver, S. M. (1969): Measurement of the relative sweetness of selected sweeteners and sweetener mixtures. *Journal of Food Science* 34 (2), S. 215-222.
- Suez, J.; Korem, T.; Zeevi, D.; Zilberman-Schapira, G.; Thaiss, C. A.; Maza, Israeli, D.; Zmora, N.; Gilad, S.; Weinberger, A.; Kuperman, Y.; Harmelin, A.; Kolodkin-Gal, I.; Shapiro, H.; Halpern, Z.; Segal, E.; Elinav, E. (2014): Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *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. *Gut Microbes* 6 (2), S. 149-155.
- Sugimoto, Y.; Kawai, S.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Kano, K. (2015): Function of C-terminal hydrophobic region in fructose dehydrogenase. *Electrochimica Acta* 176, S. 976-981.
- Sun, Y.; Hayakawa, S.; Ogawa, M.; Izumori, K. (2007): Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. *Food Control* 18 (3), S. 220-227.
- Swithers, S. E. (2013): Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24 (9), S. 431-441.
- Tabor, S.; Richardson, C. C. (1985): A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (4), S. 1074-1078.
- Takayama, S.; Sieber, S. M.; Adamson, R. H.; Thorgeirsson, U. P.; Dalgard, D. W.; Arnold, L. L.; Cano, M.; Eklund, S.; Cohen, S. M. (1998): Long-term feeding of sodium saccharin to nonhuman primates: implications for urinary tract cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 90 (1), S. 19-25.
- Tandel, K. R. (2011): Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 2 (4), S. 236.
- Teh, M. Y.; Ooi, K. H.; Danny Teo, S. X.; Bin Mansoor, M. E.; Shaun Lim, W. Z.; Tan, M. H. (2019): An expanded synthetic biology toolkit for gene expression control in *Acetobacteraceae*. *ACS Synthetic Biology* 8 (4), S. 708-723.
- Terada, O.; Suzuki, S.; Kinoshita, S. (1961): Occurrence of 5-ketofructose during kojic acid formation from sorbose by *Acetobacter* species. *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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2), S. 211-222.
- Topping, D. L.; Clifton, P. M. (2001): Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* 81 (3), S. 1031-1064.

- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (9), S. 4350-4354.
- Trautner, C.; Icks, A.; Haastert, B.; Plum, F.; Berger, M. (1997): Incidence of blindness in relation to diabetes: a population-based study. *Diabetes Care* 20 (7), S. 1147-1153.
- Trivedi, U. B.; Lakshminarayana, D.; Kothari, I. L.; Patel, P. B.; Panchal, C. J. (2009): Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme. *Sensors and Actuators B: Chemical* 136 (1), S. 45–51.
- Troyano, E.; Martinez-Castro, I.; Olano, A. (1992): Kinetics of galactose and tagatose formation during heat-treatment of milk. *Food Chemistry* 45 (1), S. 41-43.
- Tsukada, Y.; Perlman, D. (1972): The fermentation of L-sorbose by *Gluconobacter melanogenus*. I. General characteristics of the fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 14 (5), S. 799-810.
- Tzortzis, G.; Goulas, A. K.; Baillon, M. L.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A. (2004): In vitro evaluation of the fermentation properties of galactooligosaccharides synthesised by  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (1), S. 106-111.
- Vaccari, G.; Tamburini, E.; Sgualdino, G.; Urbaniec, K.; Klemeš, J. (2005): Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. *Journal of Cleaner Production* 13 (5), S. 499-507.
- Van der Berg; Ellis, R. J.; Dobson, C. M. (1999): Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The EMBO Journal* 18 (24), S. 6927-6933.
- 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. *American Journal of Public Health* 97 (4), S. 667-675.
- Vastenavond, C. M.; Bertelsen, H.; Hansen, S. J.; Laursen, R. S.; Saunders, J.; Eriknauer, K. (2012): Tagatose (D-tagatose). *Alternative Sweeteners* 13, S. 197-222.
- Vlasuk, G. P.; Inouye, S.; Ito, H.; Itakura, K.; Inouye, M. (1983): Effects of the complete removal of basic amino acid residues from the signal peptide on secretion of lipoprotein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 258 (11), S. 7141-7148.
- Von Heijne, G. (1984): How signal sequences maintain cleavage specificity. *Journal of Molecular Biology* 173 (2), S. 243-251.
- Von Heijne, G. (1990): The signal peptide. *Journal of Membrane Biology* 115 (3), S. 195-201.
- Von Wright, A.; Bruce, Å. (2003): 7. Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 14 (5-8), S. 264-276.
- Vuilleumier, S. (1993): Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition* 58 (5), S. 733-736.
- Wandersman, C. (1992): Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends in Genetics* 8 (9), S. 317-322.
- Wandersman, C.; Delepelaire, P. (1990): TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (12), S. 4776-4780.

- Wang, G. J.; Volkow, N. D.; Thanos, P. K.; Fowler, J. S. (2009): Imaging of brain dopamine pathways. Implications for understanding obesity. *Journal of Addiction Medicine* 3 (1), S. 8-18.
- Wanker, E.; Huber, A.; Schwab, H. (1995): Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5), S. 1953-1958.
- Warchol, M.; Perrin, S.; Grill, J. P.; Schneider, F. (2002): Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Letters in Applied Microbiology* 35 (6), S. 462-467.
- Weidenhagen, R.; Bernsee, G. (1960): Über ein bakterielles Dehydrierungsprodukt der Fructose (6-aldo-D-Fructose). *Chemische Berichte* 93 (12), S. 2924-2928.
- Weihrauch, M. R.; Diehl, V. (2004): Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk? *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. *Jama* 303 (15), S. 1490-1497.
- White, J. S. (2014): High-Fructose Syrup - So, What Is It Exactly? *Dietary Sugars and Health* 6, S. 85-86.
- Whitehouse, C. R.; Boullata, J.; McCauley, L. A. (2008): The potential toxicity of artificial sweeteners. *Aaohn Journal* 56 (6), S. 251-261.
- Whysner, J.; Williams, G. M. (1996): Saccharin mechanistic data and risk assessment: urine composition, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacology & Therapeutics* 71 (1-2), S. 225-252.
- Wong, D. W. (1995): Xylose isomerase. *Food Enzymes*. Springer, Boston, MA. S. 358-383.
- Woodward, M.; Walker, A. R. (1994): Sugar consumption and dental caries: evidence from 90 countries. *British Dental Journal* 176 (8), S. 297-302.
- Woting, A.; Blaut, M. (2016): The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients* 8 (4), S. 202-221.
- Wu, H.; Tremaroli, V.; Bäckhed, F. (2015): Linking microbiota to human diseases: a systems biology perspective. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26 (12), S. 758-770.
- Wyrobnik, D. H.; Wyrobnik, I. H. (2009): Agent for use in the case of disorders of blood sugar metabolism, including diabetes. United States Patent (US20090214620 A1)
- Wyrobnik, D. H.; Wyrobnik, I. H.; Silcoff, E. R. (2013): Agent for reducing the useable calorie content of food and for therapeutic reduction of weight, in particular for use in the case of adiposity (obesity). United States Patent (US20130236593 A1)
- Wyse, R. (1979): Parameters controlling sucrose content and yield of sugarbeet roots. *Journal of American Society of Sugar Beet Technologists* 20 (4), S. 368-385.
- Yadav, A. K.; Singh, S.; Dhyani, D.; Ahuja, P. S. (2011): A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* 91 (1), S. 1-27.
- Yamada, Y.; Aida, K.; Uemura, T. (1966): A new enzyme, D-fructose dehydrogenase. *Agricultural and Biological Chemistry* 30 (1), S. 95-96.

- Yamanaka, K. (1974): Enzymatic assay of D-xylose isomerase with D-sorbitol dehydrogenase. *Agricultural and Biological Chemistry* 38 (10), S. 2035-2037.
- Yang, Q.; Zhang, Z.; Gregg, E. W.; Flanders, W. D.; Merritt, R.; Hu, F. B. (2014): Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults. *JAMA Internal Medicine* 174 (4), S. 516-524.
- Yin, K.; Li, F.; Wang, Y.; He, Q.; Deng, Y.; Chen, S.; Liu, C. (2017): Oxidative transformation of artificial sweetener acesulfame by permanganate: Reaction kinetics, transformation products and pathways, and ecotoxicity. *Journal of Hazardous Materials* 330, S. 52-60.
- Yun, J. W. (1996): Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology* 19 (2), S. 107-117.
- Zahid, N. (2017). Osmotic stress response in the industrially important bacterium *Gluconobacter oxydans*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Zahid, N.; Deppenmeier, U. (2016): Role of mannitol dehydrogenases in osmoprotection of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (23), S. 9967-9978.
- Zahid, N.; Schweiger, P.; Galinski, E.; Deppenmeier, U. (2015): Identification of mannitol as compatible solute in *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (13), S. 5511-5521.
- Zeiser, J.; Mühlenbeck, L. H.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2014): Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5), S. 2067-2079.
- Zhang, W.; Yu, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. (2016): Recent advances in D-allulose: physiological functionalities, applications, and biological production. *Trends in Food Science & Technology* 54, S. 127-137.
- 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. *Plant Physiology* 115 (2), S. 609-616.

## 7. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich nach drei Jahren als Doktorandin im IfMB bei allen Personen bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt und die Anfertigung meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle danke ich **Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier** für die Möglichkeit, meine Dissertation an einem so interessanten und angewandten Thema durchführen zu können. Außerdem möchte ich mich für die intensive Betreuung, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und hilfreichen Ratschläge bedanken.

**Frau PD Dr. Christiane Dahl** möchte ich hiermit dafür danken, dass sie sich zur Übernahme des Korreferats bereit erklärt hat. Zudem bedanke ich mich für die zahlreiche Unterstützung ihrerseits während des Masterstudiengangs Mikrobiologie.

**Bei Prof. Dr. Lukas Schreiber** möchte ich mich dafür bedanken, dass er sich so freundlich bereit erklärt hat, meine Arbeit als fachnaher Gutachter zu bewerten.

Ein besonderes Dankeschön gilt **Prof. Dr. Anne-Katrin Mahlein**, die mich bereits in meiner Masterarbeit betreut und gefördert hat und sich aus Göttingen die Zeit nimmt, das fachfremde Gutachten meiner Doktorarbeit anzufertigen.

Als nächstes möchte ich mich von Herzen bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Deppenmeier für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Euch allen, **Konrad, Jacqueline, Rebecca, Laura, Fabi, Franz, Marcel, Andre und Thomas sowie Natalie und Elisabeth** danke ich für die liebe Unterstützung in den letzten drei Jahren. Ihr alle hattet in jeder Situation ein offenes Ohr, eine helfende Hand und motivierende Worte für mich und habt diesen Weg sehr bereichert. Ich danke euch außerdem für die vielen lustigen Gespräche, Eure Ratschläge, die Pausen und die Zeit im Labor.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinen Freundinnen **Jacq, Rebecca und Laura** dafür bedanken, dass Ihr immer für mich da wart und ich mit allen Anliegen und Blödeleien zu Euch kommen konnte. Ihr drei wart auf eure eigene Art eine riesen Unterstützung und ich bin froh, dass wir eine so tolle und lustige Zeit zusammen haben konnten. Als Ehrenmitglied dieser Frauenrunde darf auch **Fabi** nicht vergessen werden. Ich danke dir für dein offenes Ohr, deine motivierenden Worte und dafür, dass ich dir so viele wissenschaftliche Fragen stellen durfte (und du sie natürlich beantworten konntest).

Auch **Konrad** möchte ich an dieser Stelle nochmal explizit danken. Auf dich war menschlich und fachlich in jeder Situation verlass. Ich habe sehr viel von dir gelernt und du hast dir immer viel Zeit für hilfreiche Diskussionen genommen. Außerdem danke ich dir, dass du meine Arbeit so sorgfältig gegengelesen hast, obwohl du vermutlich mehr als genug eigene Aufgaben zu erledigen hattest.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Fernab vom IfMB möchte ich an dieser Stelle auch meine Freunde erwähnen, die mich trotz zahlreicher Absagen an Wochenenden, an denen ich stattdessen im Labor stand, immer unterstützt haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt **Marius, meinen Eltern** und **meiner Schwester Sandra**, die mir durch Ihre Unterstützung jeglicher Art diesen Weg ermöglicht haben.

## 8. Publikationsliste

### Veröffentlichungen

**Hoffmann, J. J.; Hövels, M.; Kosciow, K.; Deppenmeier, U. (2020):** Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *Journal of Biotechnology* 307, S. 164-174. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.11.001.

**Schiessl, J.; Kosciow, K.; Garschagen, L. S.; Hoffmann, J. J.; Heymuth, J.; Franke, T.; Deppenmeier, U. (2021):** Degradation of the low-calorie sugar substitute 5-ketofructose by different bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (6), S. 2441-2453. DOI: 10.1007/s00253-021-11168-3.

### Poster

**Hoffmann, J. J.; Hövels, M.; Deppenmeier, U. (2017):** Microbial production of prebiotics and low calorie sweeteners from sucrose and starch (based on the BioSC boost fund project „Glufact“). 2. Bioeconomy Science Center (BioSC) Symposium, Köln.

**Hoffmann, J. J.; Schiessl, J.; Deppenmeier, U. (2018):** Production of the low-caloric sweetener 5-ketofructose in *Gluconobacter* sp. 5. Internationale Tagung über Essigsäurebakterien 2018, Freising.

**Hoffmann, J. J.; Kosciow, K.; Schiessl, J.; Siemen, A.; Deppenmeier, U. (2018):** Production of the low-caloric sweetener 5-ketofructose in *Gluconobacter oxydans*. VAAM Jahrestagung 2018, Wolfsburg.

**Hoffmann, J. J.; Deppenmeier, U. (2019):** Production of the low-caloric sweetener 5-Ketofructose in *Gluconobacter species*. VAAM Jahrestagung 2019, Mainz.

**Hoffmann, J. J.; Deppenmeier, U. (2020):** Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter strains*. VAAM Jahrestagung 2020, Leipzig.