

**Biotechnologische Produktion der Plattformchemikalie
Succinat durch das Darmbakterium *Phocaeicola vulgatus***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Rebecca Lück

aus

Bergisch Gladbach

Bonn, 2023

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

2. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 16.08.2023

Erscheinungsjahr: 2023

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Lück, R., Deppenmeier, U. (2022): Genetic tools for the redirection of the central carbon flow towards the production of lactate in the human gut bacterium *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106 (3), 1211-1225. doi: 10.1007/s00253-022-11777-6.

Neff, A., Lück, R., Hövels, M., Deppenmeier, U. (2023): Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. *Anaerobe*, 81, 102742. doi: 10.1016/j.anaerobe.2023.102742.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Die humane Intestinalmikrobiota	1
1.2. Die Ordnung <i>Bacteroidales</i>	3
1.2.1. Der Organismus <i>Phocaeicola vulgatus</i>	3
1.3. Biotechnologische Produktion von Succinat	7
1.4. Genetische Manipulation von Bacteroidota-Spezies	8
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Chemikalien und Materialien	10
2.1.1. Chemikalien	10
2.1.2. Gase	10
2.1.3. Enzyme	10
2.1.4. DNA- und Protein-Marker	11
2.1.5. Antibiotika und Medienzusätze.....	11
2.1.6. Kits	11
2.1.7. Software und Datenbanken	12
2.2. Organismen, Vektoren und Oligonukleotide.....	12
2.2.1. Organismen	12
2.2.2. Vektoren	13
2.2.3. Oligonukleotide	14
2.3. Mikrobiologische Methoden	18
2.3.1. Medien und Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>P. vulgatus</i>	18
2.3.2. Stammerhaltung von Organismen	21
2.3.3. Wachstumsbestimmung.....	21
2.4. Molekularbiologische Methoden	21
2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	21

2.4.2.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	22
2.4.3.	Bestimmung von DNA- und RNA- Konzentrationen	22
2.4.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.4.5.	Agarose Gelelektrophorese	24
2.4.6.	Restriktionsverdau.....	25
2.4.7.	DNA-Ligation.....	25
2.4.8.	Klonierung mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly	26
2.4.9.	Sequenzierung von DNA.....	27
2.4.10.	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Stämme	27
2.4.11.	Transformation von Plasmid-DNA in <i>P. vulgatus</i>	28
2.4.12.	Markerlose Deletion von Genen in <i>P. vulgatus</i>	29
2.4.13.	RNA-Isolierung.....	29
2.4.14.	qPCR und RT-qPCR.....	30
2.5.	Biochemische Methoden.....	31
2.5.1.	Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	31
2.5.2.	Zellaufschluss mittels Ultraschalls.....	32
2.5.3.	Proteinaufreinigung.....	32
2.5.4.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
2.5.5.	Auftrennung und Visualisierung von Proteinen	33
2.5.6.	Luciferase Assay.....	37
2.6.	Analytische Methoden	37
2.6.1.	Quantifizierung von Wasserstoff durch Gaschromatograph	37
2.6.2.	Quantifizierung von Stoffwechselendprodukten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatograph	38
2.7.	Photometrische Messungen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	38
2.7.1.	Charakterisierung der Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) aus <i>P. vulgatus</i>	39
2.7.2.	Bestimmung der Enzymaktivität von BVU_2499 in zellfreiem Extrakt	40
2.7.3.	Bestimmung der Enzymaktivität des LUT-Systems	40

2.7.4.	Bestimmung der Aktivität von Enzymen des oxidativen Pentosephosphatwegs	41
2.7.5.	Nachweis von Formiat im Kulturüberstand über eine Formiat-Dehydrogenase	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Entwicklung eines Systems zur gezielten genetischen Manipulation von <i>P. vulgatus</i>	44
3.1.1.	Transfer des genomintegrativen Vektors pMM656	44
3.1.2.	Transfer des <i>shuttle</i> -Vektors pG106.....	49
3.2.	Charakterisierung der Lactat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	50
3.2.1.	Bioinformatische Analyse von <i>bvu_2499</i>	50
3.2.2.	Klonierung, Überproduktion und Aufreinigung von BVU_2499.....	51
3.2.3.	Bestimmung kinetischer Parameter der D-LDH aus <i>P. vulgatus</i>	53
3.3.	Homologe Expression von <i>bvu_2449</i> in <i>P. vulgatus</i>	54
3.3.1.	Konstruktion von pMM656_ldhnP und pG106_ldhnP, sowie deren Transfer in <i>P. vulgatus</i>	55
3.3.2.	Wachstumsvergleich zwischen Wildtyp und <i>ldh</i> -Expressionsmutanten von <i>P. vulgatus</i> 57	
3.3.3.	Kopienzahl und Transkriptabundanz des <i>ldh</i> -Gens in <i>P. vulgatus</i> Wildtyp und genetisch modifizierten Mutanten zur Expression von <i>bvu_2499</i>	58
3.3.4.	Enzymaktivität von D-LDH in zellfreiem Extrakt von <i>P. vulgatus</i>	60
3.4.	Einfluss der Enzymaktivität der D-LDH auf das Verhältnis der Stoffwechsellendprodukte von <i>P. vulgatus</i>	61
3.5.	Transkriptmenge und Aktivitätsbestimmung der Enzyme des LUT-Systems in <i>P. vulgatus</i> .	63
3.6.	Genetische Manipulation des Stoffwechsels von <i>P. vulgatus</i> zur Steigerung der Succinat- Produktion durch homologe Genexpression	66
3.6.1.	Homologe Expression der Gene <i>bvu_1959-61</i> aus dem Citratzyklus von <i>P. vulgatus</i> ..	67
3.6.2.	Analysen des Pentosephosphatwegs in <i>P. vulgatus</i> – Überexpression von <i>bvu_2318</i> .	73
3.6.3.	Untersuchung der Bildung von Reduktionsäquivalenten durch die Enzyme des oxidativen Pentosephosphatwegs in <i>P. vulgatus</i>	80
3.7.	Deletion von Genen des Zentralmetabolismus von <i>P. vulgatus</i> zur Steigerung der Succinat- Ausbeute	83
3.7.1.	Konstruktion von <i>P. vulgatus</i> Δ 0984 und Δ 3649	85

3.7.2.	Ausschaltung des Propionat-Stoffwechsels in <i>P. vulgatus</i>	92
3.7.3.	Deletion der D-Lactat-Dehydrogenase (BVU_2449) in <i>P. vulgatus</i> Δ 0309-10	99
3.7.4.	Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase (BVU_2880) in <i>P. vulgatus</i> Δ 0309-10 Δ 2449.....	102
4.	Diskussion	111
4.1.	Etablierung eines genetischen Systems in <i>P. vulgatus</i>	112
4.2.	Homologe Expression von <i>bvu_2499</i> in <i>P. vulgatus</i>	115
4.3.	Biotechnologische Produktion von Succinat	121
4.4.	Genetische Manipulation des Stoffwechsels von <i>P. vulgatus</i> zur Steigerung der Succinat-Produktion	127
4.4.1.	Homologe Expression von Genen des oxidativen Citratzyklus aus <i>P. vulgatus</i>	128
4.4.2.	Homologe Expression der Transketolase des Pentosephosphatwegs aus <i>P. vulgatus</i> ...	132
4.5.	Erweiterung von Gegenselektionsmarkern für eine zielgerichtete markerlose Gendeletion zur Anwendung in <i>P. vulgatus</i>	137
4.6.	Markerlose Deletion von Genen aus dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus von <i>P. vulgatus</i> zur Steigerung der Succinat-Produktion	141
4.6.1.	Ausschaltung des Propionat-Stoffwechsels in <i>P. vulgatus</i>	142
4.6.2.	Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase in <i>P. vulgatus</i>	145
4.6.3.	Generierung von <i>P. vulgatus</i> Δ 0309-10 Δ 2449 Δ 2880 als optimierter Succinat-Produzent	146
4.7.	Strategien zur Optimierung der Succinat-Produktion in <i>P. vulgatus</i> Δ 0309-10 Δ 2449 Δ 2880	149
4.7.1.	Optimierung der Succinat-Ausbeute durch die Überexpression von Genen in <i>P. vulgatus</i> Δ 0309-10 Δ 2449 Δ 2880	149
4.7.2.	Steigerung der Succinat-Ausbeute durch die Optimierung von Prozessparametern .	151
5.	Zusammenfassung	154
6.	Literaturverzeichnis	156
7.	Danksagung	174

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetrazyklin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	<i>Brain heart infusion</i> ; Komplexmedium
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	In DNA transkribierte RNA
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
kDa	Kilodalton
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
dsDNA	<i>Double-stranded</i> DNA
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphat
DMM	<i>Defined Minimal Media</i> ; Minimalmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP-Weg	Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg
ErmR	Erythromycin-Resistenz
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> / <i>et aliae</i> (und andere)
E4P	Erythrose-4-Phosphat
Fd _{ox}	Oxidiertes Ferredoxin
Fd _{red}	Reduziertes Ferredoxin
F6P	Fructose-6-Phosphat
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gm	Gentamycin
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₂ O _{dest} , H ₂ O _{reinst}	Destilliertes Wasser, Reinstwasser
kb	Kilobasen
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter

LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Molar (mol pro l)
mM	Milimolar
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MQ	Menachinon
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDHI	H ⁺ -translozierende NADH:Chinol-Dehydrogenase I
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nqr	Na ⁺ -translozierende NADH:Chinol-Reduktase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPW	Pentosephosphatweg
PY	<i>Peptone Yeast</i> ; Komplexmedium
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
Rnf	Ferredoxin:NAD ⁺ -Oxidoreduktase
Ru5P	Ribulose-5-Rhosphat
R5P	Ribose-5-Phosphat
sec	Sekunde
Sac	Saccharose
SCFAs	<i>Short-chain fatty acids</i> ; Kurzkettige Fettsäuren
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spp.	<i>species pluralis</i>
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Zelltrockenmasse
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenkonzentration, Volumen pro Volumen
w/v	Massekonzentration, Gewicht pro Volumen

WT	Wildtyp
X5P	Xylose-5-Phosphat
1,3-bPG	1,3-Bisphosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
2-PG	2-Phosphoglycerat
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
$\Delta_{\mu\text{H}^+}$	Elektrochemischer Protonengradient
$\Delta_{\mu\text{Na}^+}$	Elektrochemischer Natriumionengradient
%	Prozent
μ	Wachstumsrate
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ε	Extinktionskoeffizient
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1. Die humane Intestinalmikrobiota

Der menschliche Körper stellt für eine Vielzahl von Bakterien ein bevorzugtes Habitat dar. Dabei werden alle Mikroorganismen, welche in Koexistenz auf oder im Menschen leben, als Mikroflora oder Mikrobiota bezeichnet. Der Körper eines erwachsenen (gesunden) Menschen wird von etwa 10^{14} prokaryotischen Zellen besiedelt. Diese befinden sich überwiegend im Gastrointestinaltrakt, sodass bis zu 70 % des gesamten humanen Mikrobioms die gastrointestinale Mikroflora umfasst (Sekirov *et al.*, 2010). Im Vergleich zu anderen Körperoberflächen, wie der Haut, welche aufgrund von Flüssigkeitsmangel, hoher UV-Belastung und einem niedrigen pH-Wert harsche Bedingungen als Lebensraum bietet (Byrd *et al.*, 2018), zeigt die Mikroflora des Darms eine hohe Diversität (Zhu *et al.*, 2010). Während der proximale Teil des Dünndarms etwa 10^3 - 10^4 Zellen pro ml beinhaltet, steigt die Zellzahl im distalen Dünndarm deutlich an und erreicht im Dickdarm mit 10^{11} - 10^{12} Zellen pro ml ihren Höhepunkt (Bäckhed *et al.*, 2005; O'Hara und Shanahan, 2006; Sender *et al.*, 2016). Somit stellt das Colon eines der am dichtesten und gleichzeitig vielfältig besiedelten Oberflächen auf und im Körper von Säugetieren dar (Whitman *et al.*, 1998; O'Hara und Shanahan, 2006; Musso *et al.*, 2010). Aufgrund der anoxischen Bedingungen dominieren anaeroben Bakterien den Dickdarm. Dazu zählen vornehmlich die Phyla Bacteroidota, Bacillota, Actinobacteria, Proteobacteria und Verrucomicrobia (*Akkermansia*) (Qin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014).

Die am besten biologisch untersuchte Funktion der Mikroorganismen der menschlichen Darmflora, vor allem die des Phylum Bacteroidota, ist der Abbau von Heteropolysacchariden im Colon (Thomas *et al.*, 2011). Kohlenhydrate stellen den größten Anteil der normalen menschlichen Ernährung dar und bilden somit die hauptsächliche Nahrungsquelle für den Wirt und seine Intestinalflora. Disaccharide, wie Lactose, Maltose und Saccharose, können von Säugetieren leicht zu Monosacchariden abgebaut und die generierten einfachen Zucker, wie Glucose, Fructose und Galactose im proximalen Dünndarm durch aktiven Transport direkt aufgenommen werden (Ferraris, 2001). Durch die entsprechenden Enzyme des Wirtsorganismus wird auch der Abbau dieser Monosaccharide gewährleistet. Komplexe Polysaccharide können hingegen nicht durch den Menschen verdaut werden, da entsprechende Enzyme zur Hydrolyse fehlen (de Vos *et al.*, 2022). Daher erreichen diese Heteropolysaccharide den Dickdarm weitestgehend unverändert und stellen für die ansässigen Bakterien die entscheidende Energiequelle dar. Über spezielle Enzymsysteme werden komplexe, pflanzliche Polymere, wie Ballaststoffe, schrittweise hydrolysiert und somit verwertbar gemacht (Flint *et al.*, 2012; Gorkiewicz und Moschen, 2018).

2 Einleitung

Der enzymatische Abbau dieser polymeren Substanzen führt zur Bildung kurzkettiger Fettsäuren (*short chain fatty acids* = SCFAs) (Cummings und Macfarlane, 1997; Wong *et al.*, 2006). Diese werden wiederum vom Wirt als Energiequelle genutzt (Shanahan, 2002), indem SCFAs in das Darmlumen abgegeben und anschließend durch die Darmepithelzellen (Kolonozyten) des Wirtes resorbiert werden (Wong *et al.*, 2006).

Die Haupt-SCFAs, welche durch die mikrobielle Fermentation komplexer Polymere im Colon gebildet werden, sind überwiegend Acetat, Butyrat und Propionat (Cummings und Macfarlane, 1997; Morrison und Preston, 2016). Vor allem Butyrat wird eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen (Wong *et al.*, 2006). Als wichtiger Regulator der Genexpression, der Zelldifferenzierung und Apoptose transformierter Kolonozyten, soll Butyrat Darmkrebs und Entzündungen entgegenwirken (Hamer *et al.*, 2008; Berni Canani *et al.*, 2012). Als Vorstufe von SCFAs sind auch Succinat und Lactat in größeren Mengen als Stoffwechselendprodukt im Darmlumen vorzufinden (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Der Einfluss von Succinat ist bisher umstritten, da sowohl von positiven, als auch negativen Wirkungen berichtet wurde. Darunter fällt die fördernde Wirkung auf die Glucosehomöostase oder die Reduktion von Fettleibigkeit und metabolische Dysfunktion, aber auch die Förderung entzündlicher Reaktionen (Tannahill *et al.*, 2013; de Vadder *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Wan *et al.*, 2020). Auch Formiat ist als Stoffwechselendprodukt vorzufinden. Über die funktionelle Rolle dieser Verbindung im Darm ist allerdings bisher nur wenig bekannt, außer, dass Formiat im Zuge der Methanogenese weitestgehend abgebaut wird und vermutlich unter entzündlichen Bedingungen vermehrt vorliegt (Bereswill *et al.*, 2011; Vanderhaeghen *et al.*, 2015; Morrison und Preston, 2016). Acetat ist das am häufigste im Colon vorzufindende SCFA. Die Stoffwechselwege, welche zur Produktion von Acetat führen, sind innerhalb der verschiedenen Bakterien-Phyla weit verbreitet, während die Wege zur Propionat-, Butyrat- und Lactatproduktion weniger umfassend erscheinen (Morrison und Preston, 2016). So ist beispielsweise die Bildung von Propionat zwar über eine Reihe von Phyla verteilt, wird jedoch innerhalb dieser von relativ wenigen Bakteriengattungen dominiert (Reichardt *et al.*, 2014). Vor allem von Spezies der Bacteroidota (beispielsweise *Bacteroides* spp., *Phocaeicola* spp. oder *Parabacteroides* spp.) wird Propionat über die Vorstufe Succinat gebildet (Reichardt *et al.*, 2014; Flint *et al.*, 2015). Für die Bildung von Butyrat hingegen sind ausschließlich Gattungen innerhalb der Klasse *Clostridia* verantwortlich (Flint *et al.*, 2015).

Trotz des essenziellen Einflusses der intestinalen Flora auf den menschlichen Organismus ist die Zusammensetzung und die Vielfalt dieser Mikroorganismen sehr individuell (Alonso und Guarner, 2013). Vor allem die Ernährung, genetische Veranlagungen und die Einnahme von Medikamenten beeinflussen die Diversität der humanen Darmmikrobiota (Alonso und Guarner, 2013; Fan und

3 Einleitung

Pedersen, 2021). In der Vergangenheit wurde versucht die Vielfalt dieser intestinalen Gesellschaft in übersichtliche Kern-Mikrobiota, durch die Zuweisung in distinkte Enterotypen, zu kategorisieren. Diese Enterotypen werden dabei nach der jeweiligen Habitat-dominierenden Spezies benannt, bei der es sich vornehmlich um Arten der Gattung *Bacteroides*, *Ruminococcus* oder *Prevotella* handelt (Arumugam *et al.*, 2011). In den vergangenen Jahren wurde das Schema der Enterotypen jedoch hinterfragt, da nicht alle humanen Darmflora konstant einem bestimmten Enterotypen zugeordnet werden können (Cheng und Ning, 2019). Dennoch hat die Darmflora einen nachweislichen Einfluss auf die Gesundheit des Menschen (Human Microbiome Project Consortium, 2012), weshalb die Definition einer gesunden Darmmikrobiota auch zukünftig von großem Interesse ist.

1.2. Die Ordnung *Bacteroidales*

Die Ordnung *Bacteroidales* gehört dem Phylum Bacteroidota an und umfasst anaerobe Mikroorganismen, welche die humane Darmmikrobiota dominieren (Coyne *et al.*, 2019). Innerhalb der Ordnung *Bacteroidales* gehören Arten der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* zu den prominentesten Vertretern (Moore und Holdeman, 1974; Sghir *et al.*, 2000). Bei diesen Organismen handelt es sich um gram-negative, obligat anaerobe, pleomorphe stäbchenförmige Bakterien, welche vor allem der humanen Normalflora des Intestinaltraktes angehören und im Hinblick auf die Verstoffwechslung nicht verdaulicher Kohlenhydrate eine übergeordnete Rolle in der menschlichen Physiologie einnehmen (Flint *et al.*, 2008). Als ubiquitäre Kommensale machen Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* etwa 30 % Prozent der menschlichen Darmmikrobiota aus (Moore und Holdeman, 1974; Sghir *et al.*, 2000). Da entsprechende Arten ausschließlich in der Gastrointestinalflora von Säugetieren angesiedelt sind, deutet dies gleichermaßen auf eine starke Anpassung an die Darmumgebung hin. Folglich sind mit durchschnittlich 10^{11} Zellen pro g Stuhl *Bacteroides* eine der dominierenden Gattungen im Colon des Menschen (Wexler und Goodman 2017) und nehmen dementsprechend eine wichtige Rolle im Ökosystem des Dickdarms ein.

1.2.1. Der Organismus *Phocaeicola vulgatus*

Das früher als *Bacteroides vulgatus* bekannte Darmbakterium *Phocaeicola (P.) vulgatus* gehört dem Phylum Bacteroidota an und wurde erstmalig im Jahre 1933 aus humanen Faeces isoliert (Eggerth und Gagnon, 1933). Die genomische Gesamtdivergenz einiger Mikroorganismen der Gattung *Bacteroides* zu dem Typenstamm *Bacteroides fragilis* führte im Jahr 2019 jedoch zu einer phylogenetischen Neueinordnung in die Gattung *Phocaeicola* (Garzía López *et al.*, 2019). Dadurch erfolgte auch die

4 Einleitung

Neueinordnung von *B. vulgatus* in die Gattung *Phoaeicola*. Bei *P. vulgatus* handelt es sich um ein gram-negatives, obligat anaerobes, pleomorphes und stäbchenförmiges Bakterium, welches zu den zahlreichsten Organismen der gastrointestinalen Mikrobiota zählt (Salyers, 1984). Eine bioinformatische Analyse des zentralen Energie- und Kohlenstoffmetabolismus, sowie der Atmungskette von *P. vulgatus* wurde bereits in der Dissertation von Franke (2020) behandelt. Im Genom von *P. vulgatus* werden alle für den Emden-Meyerhoff-Parnas-Weg (EMP-Weg) notwendige Enzyme, als auch die Schlüsselenzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (BVU_2796) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (BVU_2795) des oxidativen Zweigs des Pentosephosphatwegs (PPW) kodiert. Somit ist eine cytoplasmatische Verstoffwechslung von Zuckern über den PPW, als auch über den EMP-Weg, möglich (Franke, 2020). Das Modell des Zentralstoffwechsels von *P. vulgatus* zeigt, dass die aufgenommene Glucose zunächst über den EMP-Weg bis zu Phosphoenolpyruvat (PEP) metabolisiert wird (Abb. 1). Von hier aus teilt sich der Stoffwechsel in zwei Wege auf. Im respiratorischen Zweig des Zentralmetabolismus wird PEP durch eine PEP-Carboxykinase (BVU_0938) unter Generierung von ATP zu Oxalacetat (OAA) carboxyliert. Entsprechend dem reduktiven Abschnitt des Citratzyklus wird OAA weiter durch eine Malat-Dehydrogenase (BVU_0462) zu Malat reduziert. Durch die Aktivität der Fumarase (BVU_1859) wird Malat dehydriert, sodass Fumarat entsteht. Dieses dient als terminaler Elektronenakzeptor der anaeroben Atmungskette von *P. vulgatus* und wird durch die Fumarat-Reduktase (BVU_1239-1241) zu Succinat reduziert. Im Vergleich zu anderen relevanten Darmbakterien, wie *Prevotella (P.) copri*, existieren im Genom von *P. vulgatus* alle Gene zur Synthese von Propionat. Ausgehend von Succinat wird dieses zunächst durch eine CoA-Transferase (BVU_1163) zu Succinyl-CoA konvertiert, gefolgt von einer Umlagerungsreaktion zu (R)-Methylmalonyl-CoA durch eine Methylmalonyl-CoA-Mutase (BVU_0309-0310). Durch die Aktivität einer Methylmalonyl-CoA-Epimerase (BVU_2492) folgt eine Konfigurationsänderung von (R)-Methylmalonyl-CoA zu (S)-Methylmalonyl-CoA, welches anschließend durch eine Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (BVU_1465/2491/3102) zu Propionyl-CoA decarboxyliert wird. Dieses wird schließlich zu Propionat umgesetzt, wobei die CoA-Transferase Coenzym CoA auf Succinat überträgt. Das freigesetzte CO₂ kann von der PEP-Carboxykinase zur Bildung von OAA genutzt werden, sodass der CO₂-Bedarf dieser Carboxylierungsreaktion zur Bildung von Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor kompensiert werden kann. Folglich ermöglicht dieser Stoffwechselweg ein „Recycling“ von CoA und CO₂. Zusätzlich werden neben der Freisetzung von CO₂ durch die Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA Natriumionen über die Cytoplasmamembran transloziert, was einer zusätzlichen Energiekonservierung dient. Der fermentative Zweig des Stoffwechsels von *P. vulgatus* startet ebenfalls von PEP ausgehend von der Umwandlung zu Pyruvat durch eine Pyruvat-Kinase (BVU_0876), wobei ATP generiert wird. Das Pyruvat wird weiter durch eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase

5 Einleitung

(BVU_3787) oder durch eine Pyruvat-Formiat-Lyase (BVU_2880) zu Acetyl-CoA metabolisiert. Bei zuletzt genannter Reaktion entsteht zusätzlich Formiat als fermentatives Endprodukt. Durch die Reaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase wird CO_2 und reduziertes Ferredoxin (Fd_{red}) freigesetzt, welches in der Atmungskette von *P. vulgatus* als Elektronendonator dient. Das durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase oder durch die Pyruvat-Formiat-Lyase gebildete Acetyl-CoA wird schlussendlich durch eine Phosphotransacetylase (BVU_0523) und eine Acetat-Kinase (BVU_0524) in Acetat umgewandelt, erneut unter Generierung von ATP. Sowohl Acetat, als auch Formiat akkumulieren im umliegenden Medium als fermentative Endprodukte.

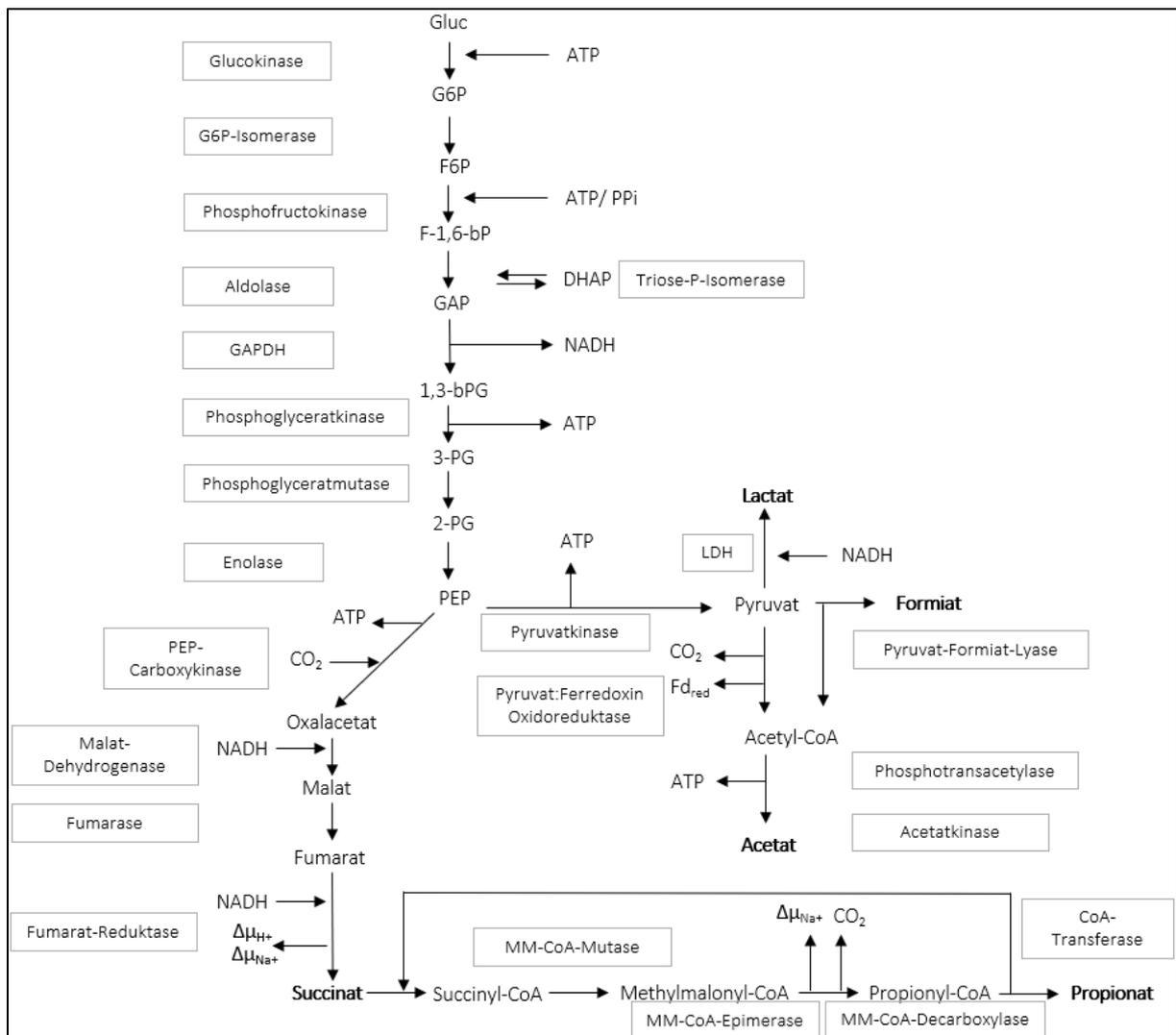


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus*. Gluc = Glucose; G6P = Glucose-6-Phosphat; F6P = Fructose-6-Phosphat; PPi = Pyrophosphat; F-1,6-bP = Fructose-1,6-Bisphosphat; GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DHAP = Dihydroxyacetonphosphat; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; 1,3-bPG = 1,3-Bisphosphoglycerat; 3-PG = 3-Phosphoglycerat; 2-PG = 2-Phosphoglycerat; PEP = Phosphoenolpyruvat; LDH = Lactat-Dehydrogenase.

6 Einleitung

Wie bereits erwähnt, stellen die im Zuge des Kohlenstoffmetabolismus generierten Reduktionsäquivalente NADH und Fd_{red} Elektronen für die anaerobe Atmungskette von *P. vulgatus* zur Verfügung (Abb. 2). Der erste Komplex dieser Atmungskette ist eine Na^+ -translozierende Ferredoxin-NAD⁺-Oxidoreduktase (Rnf; BVU_3885-3890), welche Elektronen von Fd_{red} auf NAD⁺ überträgt, sodass NAD⁺ zu NADH reduziert wird (Seedorf *et al.*, 2008). Durch das zusätzliche Erzeugen eines Natriumionengradienten leistet diese Reaktion ebenfalls einen Beitrag zur Energiekonservierung (Schlegel *et al.*, 2012). Der zweite Enzymkomplex ist eine NADH:Chinon-Oxidoreduktase (NDH; BVU_1750-1759), welche als Komplex I der Atmungskette bezeichnet wird. Da diesem die NADH oxidierende Untereinheit (NuoE-G) fehlt, handelt es sich um eine „kopflose“ Variante von Komplex I (Abb. 2). Vermutlich nutzt diese Form des Enzymkomplexes Fd_{red} anstelle von NADH, um Elektronen in die Atmungskette zu schleusen und dadurch einen elektrochemischen H^+ -Gradienten ($\Delta\mu_{H^+}$) aufzubauen (Weerakoon und Olson, 2008; Kröniger *et al.*, 2016; Schuller *et al.*, 2019). Als Elektronenakzeptor fungiert wahrscheinlich Menachinon. Bei *P. vulgatus* stellt eine Na^+ -translozierende NADH:Chinon-Reduktase (Nqr; BVU_3234-3239) den dritten Enzymkomplex der anaeroben Atmungskette dar, welcher NADH oxidiert und die Elektronen ebenfalls auf Menachinon überträgt. Auch bei dieser Reaktion wird gleichzeitig ein Natriumionengradient erzeugt (Steuber *et al.*, 2015). Der vierte Enzymkomplex, die Fumarat-Reduktase, überträgt die vom Menachinon stammenden Elektronen auf Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor, in Folge dessen Fumarat zu Succinat reduziert wird (Cecchini *et al.*, 2002). Der fünfte Membrankomplex wird als Cytochrom-bd-Chinoloxidase (BVU_2798-2799) bezeichnet, welcher Elektronen aus dem Chinon-Pool auf Sauerstoff übertragen kann. Baughn und Malamy (2004) konnten im Falle von *Bacteroides* spp. zeigen, dass dieser Organismus unter mikroaerophilen Bedingungen eine Cytochrom-bd-Chinoloxidase nutzt, um ATP zu generieren. In Anbetracht der vorherrschenden anaeroben Bedingungen im Darm ist die Relevanz dieses Enzymkomplexes in der anaeroben Atmungskette kritisch zu betrachten. Zusätzlich wurde für den nah verwandten Darmorganismus *P. copri* gezeigt, dass unter anaeroben Bedingungen die kodierenden Gene der Cytochrom-bd-Chinoloxidase nicht transkribiert werden, weshalb auch bei diesem Organismus die respiratorische Funktion dieses Enzymkomplexes für den generellen Energiehaushalt von *P. copri* in Frage gestellt wurde (Franke, 2020). Die Aktivität einer F_1F_0 -ATP-Synthase führt schließlich zur Konservierung von Energie, in Form von ATP. Hierbei ist bemerkenswert, dass diese ATP-Synthase vermutlich ausschließlich H^+ und nicht Na^+ zur Generierung von ATP nutzen kann (Franke, 2020). Allerdings werden bei *P. vulgatus* unter strikt anaeroben Bedingungen von nur einem Enzymkomplex der Atmungskette Protonen über die Membran transloziert (Abb. 2). Hinzu kommt, dass, neben den Enzymkomplexen Rnf und Nqr der anaeroben Atmungskette, während der Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA durch die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase ebenfalls ein

7 Einleitung

Natriumionengradient erzeugt wird (Abb. 1). Somit kann nur spekuliert werden, ob möglicherweise durch einen vorhandenen $\text{Na}^+:\text{H}^+$ -Antiporter diese Problematik umgangen wird (Franke, 2020).

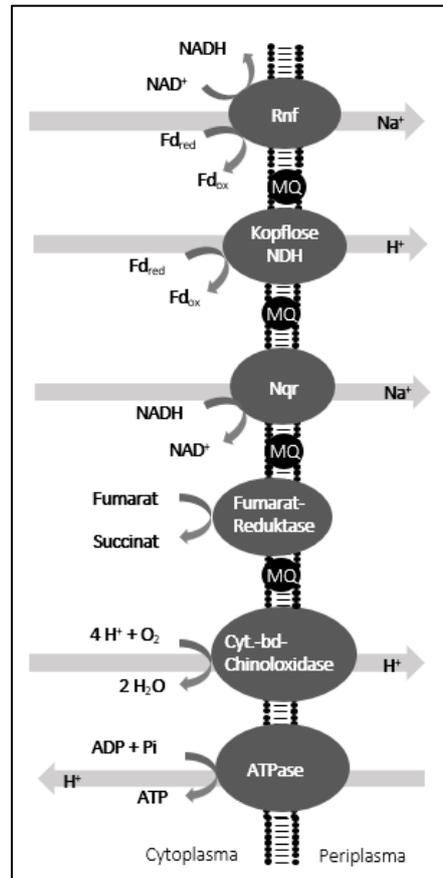


Abbildung 2: Schematische Darstellung der anaeroben Atmungskette von *P. vulgatus*. Rnf = Ferredoxin:NAD⁺-Oxidoreduktase; Nqr = Na⁺-translozierende NADH:Chinon-Reduktase; MQ = Menachinon.

Zusätzlich wird im Genom von *P. vulgatus* eine [FeFe]-Hydrogenase (BVU_0347) kodiert, welche vermutlich dazu genutzt wird, überschüssige Reduktionsäquivalente (Fd_{red}) zu recyceln, während molekularer Wasserstoff bildet wird (Wolf *et al.*, 2016). Allerdings ist die genaue physiologische Funktion solcher Hydrogenasen innerhalb des Phylums Bacteroidota bisher nicht vollends aufgeklärt (Wolf *et al.*, 2016; Greening *et al.*, 2016). Auch wenn H_2 ein zentraler Bestandteil des Gastrointestinaltrakts ist und Hydrogenasen innerhalb der Ordnung *Bacteroidales* vielfach beschrieben wurden, ist die physiologische Funktion dieser Enzyme weitestgehend ungeklärt (Carbonero *et al.*, 2012; Greening *et al.*, 2016; Wolf *et al.*, 2016).

1.3. Biotechnologische Produktion von Succinat

Als Salz der Bernsteinsäure, ist Succinat ein Baustein vieler Verbindungen innerhalb der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie (Saxena *et al.*, 2017) und somit eine der weltweit wichtigsten

Plattformchemikalien. Die Anwendungsgebiete von Succinat umfassen die Herstellung von Kosmetika, Detergenzien, Lösungsmitteln und biobasierten Polymeren, wie Polybutylen-Succinat (Nghiem *et al.*, 2017, Dessie *et al.*, 2018, Kumar *et al.*, 2020). Die aktuelle Klimadebatte und das steigende Interesse an nachhaltigen Produktionsprozessen fördern den Umstieg der traditionell petrochemisch-basierten Succinat-Herstellung hin zu umweltfreundlichen, biobasierten Produktionswegen (Dessie *et al.*, 2018; Nasser *et al.*, 2021). Im Fokus dessen steht vor allem die fermentative Produktion von Succinat durch Mikroorganismen, basierend auf nachwachsenden Rohstoffen (Jansen und van Gulik, 2014). Bei diesen Mikroorganismen handelt es sich meistens um anaerobe Pansenbakterien, welche bereits natürlicherweise große Mengen an Succinat produzieren (Beauprez *et al.*, 2010; Ahn *et al.*, 2016). Grundsätzlich wird Succinat durch Mikroorganismen als Intermediat des Citratzyklus, des Glyoxylatwegs und als Endprodukt der Fumarat-Atmung gebildet (van der Werf *et al.*, 1997; Jantama *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2010; Nghiem *et al.*, 2017). Im Zuge der anaeroben Atmungskette dient Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor, welcher durch die membrangebundene Fumarat-Reduktase zu Succinat reduziert wird. Aus diesem Grund eignen sich vor allem Fumarat-Atmer, wie *P. vulgatus*, für eine industrielle und nachhaltige Produktion von Succinat. Zusätzlich zählen Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* zu den häufigsten xylanolytischen Mikroorganismen der humanen Darmflora und sind in der Lage eine Vielzahl pflanzlicher Polysaccharide zu verstoffwechseln (Dehority, 1966; Chassard *et al.*, 2007). Durch die Metabolisierung entsprechender Verbindungen produzieren Arten dieser Gattungen von Natur aus erhebliche Mengen an Succinat. Da auch *P. vulgatus* pflanzliche Polysaccharide verstoffwechseln kann und dadurch Succinat als Stoffwechselendprodukt bildet, eignet sich dieses Bakterium für eine umweltfreundliche Succinat-Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen (Chassard *et al.* 2007; Bryant *et al.* 1958; Dehority, 1966).

1.4. Genetische Manipulation von Bacteroidota-Spezies

Prinzipiell ist für eine biotechnologische Produktion von Plattformchemikalien eine zielgerichtete Manipulation des Stoffwechsels des entsprechenden Modelorganismus von Vorteil. Dies beinhaltet unter anderem die Überexpression von Genen, wodurch der Kohlenstofffluss in die Richtung der Synthese des gewünschten Produkts gelenkt werden kann. Durch eine zielgerichtete Deletion von Genen können kompetitive Stoffwechselwege unterbrochen und die Produktion von Nebenprodukten unterbunden werden. Bisher wurden Bacteroidota-Spezies, *P. vulgatus* eingeschlossen, für biotechnologische Verfahren zur effizienten und nachhaltigen Produktion von Succinat noch nicht eingesetzt. Ein Grund dafür ist, dass für eine Manipulation des Stoffwechsels der entsprechende Organismus generell genetisch zugänglich sein muss, sodass das Einbringen von rekombinanter DNA

in die Zelle, sowie die Deletion chromosomaler Gene, umsetzbar ist. Die meisten bisher bewährten Systeme zur gezielten Genmanipulation von Mikroorganismen stammen aus Proteobakterien. Allerdings unterscheiden sich Arten des Phylums Bacteroidota hinsichtlich spezifischer genetischer Eigenschaften, wie Promotor-Konsensussequenzen, Ribosomenbindestelle und Codon Usage, von Arten des Phylums Proteobacteria (Parker und Smith, 2012). Dadurch wird eine Übertragung dieser Systeme zusätzlich erschwert (Smith *et al.*, 1992; Vingadassalom *et al.*, 2005). In den letzten Jahren wurden jedoch einige *shuttle*-Vektoren mit konstitutiven oder induzierbaren Promotoren für eine regulierten Genexpression für Arten der Ordnung *Bacteroidales* entwickelt (Smith 1995; Hamady *et al.*, 2008; Parker und Smith, 2012; Horn *et al.*, 2016; Lim *et al.* 2017; Jones *et al.*, 2020). Ebenso existieren mittlerweile *suicide*-Vektoren, welche in Kombination mit Erythromycin-basierter Selektion (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2009; Nakayama-Imaohji *et al.*, 2012) und antibakteriellen Gegenselektionsmarkern (García-Bayona und Comstock, 2019; Bencivenga-Barry *et al.*, 2020) eine markerlose Deletion von Genen ermöglichen. Allerdings wurden diese Plasmidsysteme überwiegend in *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis* und *B. ovatus* angewendet. Da diese Organismen innerhalb der Ordnung *Bacteroidales* der Risikogruppe 2 angehören, ist ein industrieller Einsatz dieser Organismen als Produktionsstamm für eine nachhaltigen Succinat-Produktion ausgeschlossen.

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Als eine der weltweit wichtigsten Plattformchemikalien ist die nachhaltige Produktion von Succinat durch die Fermentation nachwachsender Rohstoff aus biotechnologischer Sicht von besonderem Interesse. Da *P. vulgaris* entsprechende Enzymsysteme für den Abbau komplexer, pflanzlicher Polysaccharide besitzt und durch dessen Verstoffwechslung bereits große Mengen an Succinat produziert, ist dieser Organismus ein vielversprechender Kandidat für eine biobasierte Succinat-Produktion. Generell ist für eine Steigerung der Ausbeute von durch Mikroorganismen produzierte Plattformchemikalien eine zielgerichtete Manipulation des Stoffwechsels des entsprechenden Produktionsstamms vielversprechend. Demnach war zunächst die Etablierung eines genetischen Systems zur Anwendung in *P. vulgaris* ein Ziel dieser Arbeit. Durch die Überexpression von Genen, sowie durch die Deletion von Genen sollte ermöglicht werden, den Stoffwechsel von *P. vulgaris* gezielt zu manipulieren und somit das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte beeinflussen zu können. Im Hinblick auf eine biobasierte Succinat-Produktion im biotechnologischen Maßstab sollten in dieser Arbeit weiterhin Untersuchungen zur Steigerung der Succinat-Ausbeute auf Basis der zuvor etablierten genetischen Systeme durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Materialien

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Fluka (Sigma Aldrich, München, Deutschland) im Reinheitsgrad p.a. (*pro analysi*) bezogen.

2.1.2. Gase

Die verwendeten Gase CO₂ (99,9 %) und N₂ (99,9 %) wurden von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen.

2.1.3. Enzyme

Folgende Enzyme fanden im Zuge dieser Arbeit für molekularbiologische Methoden Anwendung (Tab. 1).

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Verwendung	Firma und Sitz
OneTaq-Polymerase	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Q5-High-Fidelity DNA-Polymerase	Kolonie-PCR	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Alkalische Phosphatase FastAP	Dephosphorylierung von Vektor-DNA am 5'-Ende	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Dnase I	Verdau von DNA	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Verknüpfung von DNA-Fragmenten	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Formiat-Dehydrogenase	Aktivitätsnachweis der Pyruvat-Formiat-Lyase	Megazyme (Bray, Irland)
<i>Bsa</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Sph</i> I	Restriktionsverdau	New England Biolabs

		(Frankfurt am Main, Deutschland)
--	--	----------------------------------

2.1.4. 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.

2.1.5. Antibiotika und Medienzusätze

Zur Gewährleistung der Reinheit von Kulturen und als Selektionsmarker bei Klonierungen wurden die nachfolgend aufgelisteten Antibiotika, sowie deren Konzentrationen und entsprechenden Lösungsmittel verwendet (Tab. 2).

Tabelle 2: Einsatz von Antibiotika und weiteren Zusätzen.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	50 % Ethanol	100
Erythromycin	100 % Ethanol	100
Gentamycin	rH20	200

2.1.6. Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Verwendung	Hersteller
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Plasmid Miniprep Kit	Aufreinigung von Plasmiden	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes	Gezielte Klonierung von Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Total RNA Miniprep Kit	Aufreinigung von RNA	New England Biolabs

		(Frankfurt am Main, Deutschland)
Luna® Universal qPCR Master Mix	Quantitative Echtzeit-Bestimmung von PCR-Produkten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit	Umschreibung von RNA in cDNA und quantitative Echtzeit-Bestimmung von PCR-Produkten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Roti®-Transform	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.7. Software und Datenbanken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Internetprogramme und Softwares sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Softwares und Programme.

Programm	Verwendungszweck
Chromas 2.6.5	Auswertung von DNA-Sequenzen
ClustalΩ	Multisequenzalignment
Microsoft Office 2016	Erstellung von Text, Tabellen und Diagrammen
Snapgene	Planung, Visualisierung und Dokumentation von Klonierungen und PCR-Reaktionen
NEBcalculator	DNA-Konzentrationsbestimmung für die Assemblierung
NEBuilder Assembly Tool	Generierung spezifischer Primer für Deletionsplasmide
GraphPad Prism 8.4	Michaelis-Menten-Kinetik, Analyse von Enzymaktivitäten
DoubleDigest Calculator	Reaktionsbedingungen für DNA-Verdaue
Uniprot	Informationen zu Genen und Proteinen
KEGG	Genanalyse, Nukleotidsequenzen
NCBI BLAST	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen
Primer3	Erstellung von Oligonukleotiden für (RT-)qPCR

2.2. Organismen, Vektoren und Oligonukleotide

2.2.1. Organismen

Alle Informationen zu den verwendeten Organismen können Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Organismen.

Stamm	Eigenschaften	Ursprung
-------	---------------	----------

<i>Escherichia coli</i> NEB DH5 α	F-, supE44, Δ (lacZYA-argF)U169, ϕ 80d, lacZ Δ M15, endA1, hsdR17 (rk-mk+), thi-1, λ , recA1, gyrA96, relA1	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α λ pir S17-1	TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir	Strand et al., 2014
<i>Escherichia coli</i> β 2155	ErmR, RP4-2-Tc::Mu, dapA::(erm-pir), thrB1004, pro, thi, strA, hsdS, lacZ, M15, DAP Auxotrophie	HZI (Braunschweig, Deutschland)
<i>Phocaeicola vulgatus</i> DSM 1447	Wildtyp	Eggerth und Gagnon, 1933; Garca-Lopez et al., 2019

2.2.2. Vektoren

Alle Informationen zu den verwendeten Vektoren können Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Vektor	Eigenschaften	Ursprung
pASK-IBA3	Induzierbarer Tet-Promotor, AmpR, C-terminales Strep-tag	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK-IBA5	Induzierbarer Tet-Promotor, AmpR, N-terminales Strep-tag	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK5_ <i>ldh</i>	Derivat von pASK5, mit Sequenz des Gens BVU_2499	Diese Arbeit
pASK3_BVU_2795	Derivat von pASK3, mit Sequenz des Gens BVU_2795	Diese Arbeit
pASK5_BVU_2795	Derivat von pASK5, mit Sequenz des Gens BVU_2795	Diese Arbeit
pASK3_BVU_2796	Derivat von pASK3, mit Sequenz des Gens BVU_2796	Diese Arbeit
pASK5_BVU_2796	Derivat von pASK5, mit Sequenz des Gens BVU_2796	Diese Arbeit
pMM656	Rhamnose-induzierbare <i>nanoluc</i> Expression, pNBU2-Rückgrat, AmpR, EryR	AddGene (Massachusetts, USA)
pMM656_ <i>ldh</i> nP	Derivat von pMM656, mit 5'-UTR und Sequenz des Gens BVU_2499	Diese Arbeit
pMM656_ <i>SacB</i> _updown_BVUupp	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens BVU_0984	Diese Arbeit
pMM656_ <i>SacB</i> _updown_BVU3649	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und	Diese Arbeit

14 Material und Methoden

	<i>downstream</i> des Gens BVU_3649	
pMM656_SacB_updown_BVU0309-10	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens BVU_0309-10	Diese Arbeit
pMM656_SacB_updown_BVU2499	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens BVU_2499	Diese Arbeit
pMM656_SacB_updown_BVU2880	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens BVU_2880	Diese Arbeit
pG106	ErmAM, ErmF, <i>origin of replication</i> für <i>Bacteroides</i> spp.	Diese Arbeit
pG106_ldhnP	Derivat von pG106, mit 5'-UTR und Sequenz des Gens BVU_2499	Diese Arbeit
pG106_tktnP	Derivat von pG106, mit 5'-UTR und Sequenz des Gens BVU_2318	Diese Arbeit

2.2.3. Oligonukleotide

Die Sequenzen der Primer, die für Klonierungen, Kolonie-PCR, RT-qPCR oder Sequenzierungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide. Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen die Schnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme.

Bezeichnung	Sequenz [5' -> 3']	Restriktionss telle
screen_ermR_for	CTAATAACATTTTAGCAAACCAT	-
pMM656_tetR_screenin g_rev	GATACGCATATCGGGATGAAC	-
attB_for	CGTTGTACTGCGAGGTACC	-
attB_in Erm_rev	ATGGTTTTGCTAAAATGTTA	-
attB2451_for	TGTTCCAGCCATTCATTAATA	-
attB2094_for	ATCTCCTTTATTTAAATAG	-
Bac_16S2_for	TCAGYTGTGAAAGTTTGSGG	-
Bac_16S2_for	GTRTATCGCMAACAGCGAGTAT	-
screen_ErmAM_for	CTAATAACATTTTAGCAAACCAT	-
screen_ErmAM_rev	ATGAACAAAGTAAATATAAAAGATAG	-
pASK5_LDH_for	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGCTTATAAAATAGCTTTTTACGACAC	<i>Bsal</i>
pASK5_LDH_rev	ATGGTAGGTCTCATATCAGACTCTCCCACCGCTACTTC	<i>Bsal</i>

15 Material und Methoden

pASK_fw	GAGTTATTTTACCACTCCCT	-
pASK_rev	CGCAGTAGCGGTAACG	-
as_ldhnP_pMM656_fw	CATGCTTTTTTGCATAAAATAACGTTTGCAGAATTGTCCG	-
as_ldhnP_pMM656_rev	ATCAAAGCAAGTGCAGTTCATTAGACTCTCCCCACCGC	-
bb_pMM656_ldhnP_fw	TGAACTGCACTTGCTTTG	-
bb_pMM656_ldhnP_rev	TTTTATGCAAAAAAAGCATGATTTATG	-
screen_pmm656_fw	ACACTTAACGCTGACATGG	-
screen_pmm656_rev	CACTGGAAGATAGGCAATTAG	-
ldh_nativP_Sall_for	ATTAGTCGACTAACGTTTGCAGAATTGTCC	<i>Sall</i>
ldh_SphI_rev	AATAGCATGCTTAGACTCTCCCCACCGCTA	<i>SphI</i>
Screen_pG106_for	CGATCGGTGCGGGCCTCTTC	-
Screen_pG106_rev	AGTTAGCTCACTCATTAGGC	-
qPCR_LDH_for	TTACGGTGGCGTTGATGTTA	-
qPCR_LDH_rev	TGTTACGGGCAAAATTGTA	-
qPCR_L23_for	TCGATTGGCTTTATTGTACG	-
qPCR_L23_rev	CGCCTTCTTTCAATGTTACGA	-
qPCR_llde_for	AAGACGAATGTTGCGGTTTC	-
qPCR_llde_rev	CCTGCCGCTAAGATTTCAAC	-
qPCR_lldf_for	TAGCCGACCCAAAGCATATC	-
qPCR_lldf_rev	AGCCGGACATACAAACGAAC	-
qPCR_lldg_for	CAAACGCATCGCTTCTAAT	-
qPCR_lldg_rev	ACGCTGCTTTACATCCTGCT	-
qPCR_bvu1960_for	CGCTATGCAAGCCATAGTGA	-
qPCR_bvu1960_rev	AAAGCCACATTCAAGGAACG	-
qPCR_bvu1961_for	TATCCAGGTGGCGGATATGT	-
qPCR_bvu1961_rev	CAAATCACGAGCCAATTCT	-
qPCR_bvu1959_for	GGTTATCCGCGTAAGATGGA	-
qPCR_bvu1959_rev	GCGGTAGCTCGAATCTGTTC	-
qPCR_bvu0979_for	GCCGGGACAGGAAGGTTATA	-
qPCR_bvu0979_rev	TGACCGTAAGTCCACCGAA	-
qPCR_bvu1163_for	CGCCTTACCGTCGTGAAATT	-
qPCR_bvu1163_rev	TACCCCGTTTCATGTCAGCT	-
as_bvu_1959_for	CTATAAATGGAAAAACAATTATGGTAAAAGGTATGGTATA TG	-
as_bvu_1959_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTATCTTGCATTTAAAGCAGA G	-
as_bvu_1960_for	CTATAAATGGAAAAACAATT ATGAAAAAGACAGTACCTTATATTAC	-
as_bvu_1960_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTAGGAGTTTATTCTTTCTATT ATTTT	-
as_bvu_1961_for	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAAGAAAGAATATATCAT TTACAAAC	-
as_bvu_1961_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTATCTCTGTTTCAAAGGC	-
bb_pG016p2499_for	AATAGCATGCAAGCTTGG	-
bb_pG016p2499_rev	AATTGTTTTTCCATTTATAGTTCATATAAATAAC	-
as_bvu_tkt_for	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAACGAAAAGAACTTAT GAAC	-

16 Material und Methoden

as_bvu_tkt_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTCATGCCAGCATTCTTTTAC	-
qPCR_bvu2317_for	AAGGCATCAGCATGACATTG	-
qPCR_bvu2317_rev	CTTTTCAATGCGCTTTTGGT	-
qPCR_bvu0050_for	GATAAAGGATGCCGGAATGA	-
qPCR_bvu0050_rev	CCTGCGAACCTGTATTCGTT	-
qPCR_bvu2318_for	TGCTGTTACCAGCGAAGATG	-
qPCR_bvu2318_rev	AACTGGAATCATCCGCTTTG	-
qPCR_bvu1409_for	AGAAACCGCCTTAGCTTTCC	-
qPCR_bvu4109_rev	AACGACCGCCTACATTATCG	-
qPCR_bvu2796_for	GGCGATGTGTCTGTATGTGG	-
qPCR_bvu2796_rev	ATGGCTATGCGCTGAAGAAT	-
qPCR_bvu2795_for	GGCAAAGCTGAGGATGGTA	-
qPCR_bvu2795_rev	CAGACGTCCTTTGTCCCATT	-
qPCR_bvu3333_for	ATTGCCACCAATTACGAAGG	-
qPCR_bvu3333_rev	GCCGACAAACGGAGATACAT	-
bb_pASK5_fw	TGATATCTAACTAAGCTTGACCTG	-
bb_pASK5_rev	GGCGCCTTTTTCGAACTG	-
as_pask5_BVU2796_fw	CGCAGTTCGAAAAAGGCGCCAGTTTACCACATAGTTTATTT TTG	-
as_pask5_BVU2796_rev	TCAAGCTTAGTTAGATATCACAATTTACAGTATAAATTGGA ATGTG	-
pask5_BVU_2795_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGAAAAGGCAGATATAGGATTA TCG	-
pask5_BVU_2795_rev	ATGGTAGGTCTCATATCAATAGTTGTCTTCCAATGTTTCG G	-
as_656SacB_up_BVUup p_for	TGACATGGGAATTCCCCTCCGTACCAGACAAACCGAAG	-
as_656SacB_up_BVUup p_rev	AGTTTGAGCTATCTATGCTTTTGTATATTGTTG	-
as_656SacB_do_BVUup p_for	AAGCATAGATAGCTCAAATAAGGACAG	-
as_656SacB_do_BVUup p_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTTCTGCCTTATTACATGAATAC	-
bb_pMM656SacB_fw	AGTTCGAGAGCCTGTCTC	-
bb_pMM656SacB_rev	GGAGGGGAATTCATGTC	-
Screen_pMM656_SacB_ for	GGCTTTTAAAGCTTTAAGG	-
Screen_pMM656_SacB_ rev	CATCGGATTCTTTAATATCGC	-
qPCR_upp_for	AGCACATCATAAGAAGGATT	-
qPCR_upp_rev	ATATGCGCTACCCCTTGTTG	-
qPCR_bvu_3649_for	CAATGAGGTTTGCATCTGA	-
qPCR_bvu_3649_rev	TGGGATACGGAGTTCTCGTC	-
seq_up_bvu0984_fw	CGTTAGCATCAACTGTTACG	-
seq_do_bvu0984_rev	GATTTTAAATAAATAATAAC	-
as_656SacB_up_BVU36 49_for	TGACATGGGAATTCCCCTCC GAAGCACACAAAGCCGGC	-
as_656SacB_up_BVU36 49_rev	AAATTGGGAA AATCTTTATTTTTGTGGTTAATGGCCAG	-

17 Material und Methoden

as_656SacB_do_BVU3649_for	AATAAAGATT TTCCAATTTAGGTGTCTATATAATATG	-
as_656SacB_do_BVU3649_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACT CGTCAATTACTTCTTCTGC	-
seq_up_bvu3649_fw	TGATTATTATGATCGAACCC	-
seq_do_bvu3649_rev	AGCTTCGGCTTGGCTCAAGT	-
as_656SacB_up_bvu0309_for	TGACATGGGAATTCCCCTCCCAAAGTCACGCCCATGAAG	-
as_656SacB_up_bvu0309_rev	GTGAAAAAGCAGTTTATTCGGTATTAATATTTAAGAATTATATCACATACTTTTTT	-
as_656SacB_up_bvu0310_for	CGAATAAACTGCTTTTTACCTGAATAGTTTATC	-
as_656SacB_up_bvu0310_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTATTGTGGGTTTGCCAATATC	-
seq_up_bvu0309_fw	AGGTTGTGTAATCAAATAC	-
seq_do_bvu0310_rev	CACGTAATCCGTAGAAGAT	-
qPCR_BVU0309_fw	ACTCCGGACGACTTCTCTGA	-
qPCR_BVU0309_rev	GACTGCTTCCAGCATTCTC	-
qPCR_BVU0310_fw	ACCGTTGTTCCAACTCCTG	-
qPCR_BVU0310_rev	TTGCTACAACACCTGCCTTG	-
as_656_0309-10nP_fwd	CATGCTTTTTTGCATAAAA GATATAATACTATGTTTTTATAAATTGCC	-
as_656_0309-10nP_rev	ATCAAAGCAAGTGCAGTTCATTATTCCTCTTCGTCCAG	-
bb_pMM656_for	TGAACTGCACCTTGCTTTG	-
bb_pMM656_rev	TTTTATGCAAAAAAGCATGATTTATG	-
as_656SacB_up_bvu2880_for	TGACATGGGAATTCCCCTCCTTTTACCCGCATCTCCTG	-
as_656SacB_up_bvu2880_rev	ATATGTGATGACTGTCATTATTAAGATGATTTAGG	-
as_656SacB_up_bvu2880_for	TAATGACAGTCATCACATATACATTAATCGTAG	-
as_656SacB_up_bvu2880_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTTTCGGAACCTTTATTTCC	-
qpcr_2880_fw	AATCTGGCATATGGCGTAGC	-
qpcr_2880_rev	GTAGGACGGGCGTTTTTGTA	-
as_656SacB_up_bvu2449_for	TGACATGGGAATTCCCCTCCATACCGAGGCGGTGCGTAAG	-
as_656SacB_up_bvu2449_rev	ACAGGGGAGAAATTGTTTTCCATTTATAGTTCATATAAATAACAAAAACACGG	-
as_656SacB_up_bvu2449_for	AAAAACAATTTCTCCCCTGTAGTAATATAATAAG	-
as_656SacB_up_bvu2449_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTCTGCCTATTTTGAAGATGTC	-
seq_up_bvu2449_fw	CGATGGATAAGGCTGGTTCT	-
seq_do_bvu2449_rev	TATGATGCCGCAACGGCTGC	-
seq_up_bvu2449_fw	ATAAAAGCCTTTACTCTCAG	-
seq_do_bvu2449_rev	TTGCAATGTAGTTTCGCCGCC	-

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Medien und Kultivierung von *E. coli* und *P. vulgatus*

Zur Sterilisierung der folgend aufgelisteten Medien, wurden diese vor Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zu dem jeweiligen Medium hinzugefügt. Nach ausreichender Abkühlung der Medien wurden je nach beabsichtigter Kultivierung Antibiotika zugesetzt (Kapitel 2.1.5.). Für das Ansetzen der Medien wurde dH₂O verwendet. Zur Kultivierung von *E. coli* diente LB (*Lysogeny-Broth*)-Medium. Die Anzucht von Flüssigkulturen wurde unter aeroben Bedingungen bei 37 °C und 180 rpm durchgeführt. Für die aerobe heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* wurde stets „Maximal induction“-Medium (MI-Medium; modifiziert nach Mott *et al.* (1985)) verwendet. Dem autoklavierten Basis-Medium wurde in einfacher Endkonzentration M9-Salze hinzugefügt.

LB-Medium (*Lysogeny-Broth-Medium*)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml
pH 7,1, eingestellt mit NaOH	

MI-Medium

Basismedium

Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
H ₂ O _{dest}	ad 950 ml

20 x M9-Salze

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	120 g
KH ₂ PO ₄	60 g
NaCl	10 g
NH ₄ Cl	20 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Für die Regeneration von transformierten *E. coli*-Zellen wurde SOC-Medium eingesetzt.

SOC-Medium

Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM

19 Material und Methoden

MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Für die Anzucht von *P. vulgatus* wurde „Peptone yeast extract“-Medium (PYG-Medium, Komplexmedium; modifiziert nach DSMZ Nr.: 104), BHI-Medium oder „Defined Minimal Medium“ (DMM) verwendet.

PYG-Medium

Trypton aus Casein	5 g
Pepton aus Soja	5 g
Hefeextrakt	10 g
Fleischextrakt	5 g
Glucose	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Tween 80	1 ml
Resazurin	1 mg
Salzlösung	40 ml
L-Cystein (nachträglich)	0,5 g
Hämin-Lösung (nachträglich)	1 ml
Vitamin K1-Lösung (nachträglich)	0,2 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml pH 8

BHI-Medium

Hirn-Herz-Infus von (Frischgewebe)	8 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	5 g
Pankreatisch abgebautes Casein	16 g
Natriumchlorid	5 g
Glucose	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5 g
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml pH 8

DMM-Medium

NaHCO ₃	4 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
K ₂ HPO ₄	2,2 g
NaCl	0,9 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,75 g
FeSO ₄ -Lsg.	1 ml
SL-6	2 ml
L-Cystein (nachträglich)	0,5 g
Hämin-Lösung (nachträglich)	10 ml
Vitamin K1-Lösung (nachträglich)	0,2 ml
Butyrat (nachträglich)	0,04 M
10x Wolin (nachträglich)	0,1x

20 Material und Methoden

H₂O_{dest} ad 1000 ml

SL6-Lösung

ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	30 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Nach Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 wurde das jeweilige Medium solange begast (80 % N₂/20 % CO₂ (v/v)) bis der pH-Wert auf 7 gesenkt war. Die Kulturflaschen wurden anschließend luftdicht verschlossen und autoklaviert. Vor dem Inokulieren wurde dem PYG- bzw. BHI-Medium, Hämin-Lösung und Vitamin K1-Lösung in angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Zur Anzucht in DMM-Medium wurde vor dem Inokulieren das Substrat (Xylose oder Glucose), Butyrat, Hämin, L-Cystein, Vitamin K1 und 10 x Wolin-Lösung in angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

10x Wolin

Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Thiamin x HCl	50 mg
Na-Riboflavin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B12	1 mg
p-Aminobenzoat	50 mg
α-Liponsäure	50 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Hämin-Lösung

Hämin	50 mg
1 M NaOH	1 ml
H ₂ O _{dest}	Ad 100 ml

Vitamin K1-Lösung

Vitamin K1	0,1 ml
96 % Ethanol	Ad 20 ml

FeSO₄-Lösung

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,278 g
HCl (konzentriert)	2 Tropfen
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

2.3.2. Stammerhaltung von Organismen

Zur dauerhaften Lagerung wurden *E. coli*-Stämme über Nacht in LB-Medium angezogen. Danach wurden 800 µl der Kulturen mit 200 µl sterilem 100 %-igem (v/v) Glycerol versetzt und bei -70 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung von *Phocaeicola*-Stämmen, wurden in kleinen Serumflaschen mit Butyl-Gummistopfen 2 ml Kultur der jeweiligen Organismen 1:1 mit einer anaeroben und sterilen 50 %-igen (w/v) Saccharose-Lösung (Endkonzentration: 25 %) versetzt und etwa 20 sec mit N₂ steril begast. So präpariert wurden die Zellsuspensionen als Kryokulturen bei -70 °C eingelagert.

Um Kryokulturen zu reaktivieren, wurden diese auf Eis und unter steriler N₂-Begasung aufgetaut. Anschließend konnten die Kryokulturen zur Animpfung von PYG/BHI oder DMMG verwendet werden.

2.3.3. Wachstumsbestimmung

Um das Wachstum bakterieller Zellsuspensionen zu quantifizieren, wurden die optischen Dichten der Kulturen bei 600 nm (OD₆₀₀) photometrisch ermittelt. Da *P. vulgatus*-Medien Resazurin als Redoxindikator enthielten und sich daher bei Sauerstoffkontakt pink verfärbten, wurde den Proben Natriumdithionit zugegeben, um das Resazurin zu reduzieren. Um den Effekt der Mehrfachstreuung zu verhindern, wurden die Proben ab einer OD₆₀₀ von 0,3 mit Medium verdünnt. Als Leerwert diente ebenfalls das jeweilige Medium.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden 2x2 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und die so pelletierten Zellen für die Aufbereitung durch das Monarch® Plasmid Miniprep Kits (Tab. 3) eingesetzt. Die Durchführung der Plasmid-Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.4.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der während der PCR generierten Amplifikate erfolgte mittels Aufbereitung durch das Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) nach Angaben des Herstellers.

2.4.3. Bestimmung von DNA- und RNA- Konzentrationen

Die Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte mit Hilfe des BioPhotometers D30 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dieses misst die Absorption bei 260 nm (A_{260}), welche charakteristisch für Nukleinsäuren ist, und berechnet hierrüber deren Konzentration. Als Leerwert der Messung wurde H_2O_{reinst} verwendet. Die Messeinheit gibt auch die Verhältnisse A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} aus, welche ein Maß für Kontaminationen durch Proteine (A_{280}) und Lösungsmittel (A_{230}) sind. Bei reiner DNA und RNA liegen die Verhältnisse jeweils idealerweise bei 1,8 bis 2.

2.4.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur *in vitro*-Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen (Mullis *et al.*, 1986). Sowohl Plasmid-DNA, als auch genomische DNA können bei diesem Vorgang als Template dienen. Das Prinzip der PCR beruht auf den drei sich zyklisch wiederholenden Schritten Denaturierung, Anlagerung (*Annealing*) und Elongation. Da mit jedem Zyklus die Menge gewünschter DNA-Fragmente verdoppelt wird, führt dies zu einer exponentiellen Amplifizierung der ausgewählten DNA-Fragmente.

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. Die dadurch entstehenden Doppelstrang-Bereiche besitzen ein freies 3'-OH.

Durch den letzten Schritt des Zyklus, die Elongation, werden freie Nukleotide komplementär an das freie 3'-OH-Ende angelagert. Es entsteht ein neuer doppelsträngiger DNA-Strang. 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.

2.4.4.1. 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 10-20 sec/kb eingesetzt, welche sich durch eine extrem hohe Genauigkeit auszeichnet. Der PCR-Ansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8 und 9 aufgeführt.

Tabelle 8: PCR-Ansatz zur Gen-Amplifizierung mittels Q5 DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen
5x Q5 Reaction Buffer	10 µl
5x Q5 High GC Enhancer	10 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,5 µl
DNA	1 µl
Q5 DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl
rH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen zur Gen-Amplifizierung mittels Q5 DNA-Polymerase.

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

T_A: Anlagerungstemperatur der Primer

Der korrekte Verlauf der Amplifizierung wurde nach Abschluss der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für die Weiterverwendung der amplifizierten Fragmente, wurden diese mittels Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) aufgereinigt.

2.4.4.2. Kolonie-PCR

Um generierte Stämme auf die Aufnahme des korrekten Plasmids zu überprüfen, erfolgte der Nachweis mit Hilfe einer Kolonie-PCR. Dafür wurden die jeweiligen Klone gepickt und in 10 µl rH₂O resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl in den aufgeführten PCR-Reaktionsansatz (Tab. 10) eingesetzt, wohingegen die restlichen 5 µl in 100 µl LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft wurden. Letzteres diente zu Absicherung des Klons. Die Amplifikation der DNA-Sequenz

erfolgte über eine modifizierte One-*Taq*[®]-DNA-Polymerase (Tab. 1). Das verwendete Programm ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Kolonie-PCR mit OneTaq DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen
5x One Taq Mastermix	12,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
rH ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR mit OneTaq DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialdenaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	25 s
Annealing	T _A °C	20 s
Elongation	68 °C	1 min /kb
Finale Elongation	68 °C	5 min
Lagerung	4 °C	∞
30x zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation		

T_A: Anlagerungstemperatur der Primer

2.4.5. Agarose Gelelektrophorese

Um eine erfolgreiche Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente im Zuge der PCR zu überprüfen, wurde sich der Agarose-Gelelektrophorese bedient, mit deren Hilfe DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden können (Sambrook *et al.*, 1989). Das Prinzip basiert auf der Wanderung geladener Moleküle, hier der negativ geladenen DNA, in einem elektrischen Feld. Durch dieses wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller als große Fragmente wandern. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs verhält sich somit umgekehrt proportional zur Größe des aufzutrennenden Fragmentes. Die Laufeigenschaft wird weiterhin durch die Porengröße des Agarose-Gels bestimmt, welches durch die eingesetzte Agarose-Konzentration festgelegt wird. Je höher die Konzentration ist, umso kleiner sind die Poren und desto langsamer wandern die DNA-Fragmente in Richtung Anode. Im Zuge dieser Arbeit wurde Agarose „NEEO Ultra-Qualität“ für die Auftrennung der DNA-Fragmente 1 %-ig (w/v) in 1x TAE-Puffer gelöst und nachfolgend für die Herstellung der Gele verwendet. Für die Visualisierung der Banden wurde das Gel mit 3x GelRed™ *Nucleic Acid Gel Stain* gefärbt. Durch diese interkalierende Nukleinsäurefärbung leuchten die aufgetrennten DNA-Fragmente bei Anregung mit Licht im UV-Bereich (254 nm). Die Intensität nimmt

hierbei proportional zur DNA-Menge zu. Um die Länge der unbekanntenen DNA-Fragmente einschätzen zu können, wurde ein definierter Nukleinsäure-Marker (Kapitel 2.1.4.) verwendet.

Zusammensetzung 50x TAE-Puffer

Tris	242 g
EDTA (0,05 M)	100 ml
Essigsäure (1 M)	57,4 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml
pH-Wert auf 8 einstellen	

2.4.6. Restriktionsverdau

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 der Klonierung des Konstrukts pG106_1dhnP eingesetzt wurden, wurden durch das Onlineprogramm Double-Digest (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) ermittelt. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug 20 µl und die Inkubation wurde für 1 h bei 37 °C angesetzt. Um die Wahrscheinlichkeit einer Re-Ligation der Vektorgerüste zu verringern, wurde nach 30 min 1 µl einer alkalischen Phosphatase FastAP (Tab. 1) supplementiert, welche das DNA-Rückgrat an seinem 5'-Ende dephosphoryliert. Dadurch sollte das Vektorgerüst nur mit den gewünschten Insert-Fragmenten ligieren.

Für die Klonierung von pASK-3/-5 Vektoren enthielt der Reaktionsansatz 15 µl Vektor oder 20 µl PCR-Produkt, 2,5 µl CutSmart® Puffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) und 1 µl *Bsa*I und wurde auf 25 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37 °C

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktionen, als auch für die Aufreinigung der geschnittenen DNA-Fragmente, wurden die Reaktionsansätze im Anschluss an die Inkubation mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) behandelt.

2.4.7. DNA-Ligation

Bei der Klonierung von Plasmiden wird zunächst ein zu inserierendes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert, welches dann durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen verdaut wird, sodass es in einer anschließenden Ligation mit einem komplementär verdauten Vektorgerüst verknüpft werden kann. Die Verknüpfung der komplementären Enden wird dabei durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert,

welche unter ATP-Verbrauch die freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektorrückgrats mit den 5'-Phosphatenden des verdauten DNA-Inserts ligiert.

In dieser Arbeit wurde für die Ligation der „Instant Sticky-end Ligase Master Mix“ von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Der in Tabelle 12 dargestellte Reaktionsansatz benötigt keine Inkubationszeit und kann nach dem Durchmischen der Komponenten direkt für die Transformation eingesetzt werden. Grundvoraussetzung ist jedoch das Vorhandensein von Sticky-ends bei den für die Ligation eingesetzten DNA-Fragmenten.

Tabelle 12: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes unter Verwendung des Instant Sticky-end Ligase Master Mix.

Komponente	Menge
Insert DNA (verdaut und aufgereinigt)	2 µl
Vektor DNA (verdaut und aufgereinigt)	0,5 µl
Instant Sticky-end Ligase Master Mix	2,5 µl

2.4.8. Klonierung mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly

Diverse Klonierungsstrategien, wie die in den Kapiteln 2.4.5. und 2.4.6. beschriebene Ligationsabhängige Klonierung, konnten sich in der Molekularbiologie für die Konstruktion von Plasmiden etablieren. Eine äußerst flexible und zeitsparende Methodik ist in diesem Zusammenhang das „Seamless Cloning“, auch „Gene Assembly“ genannt, auf der das NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit basiert. Unabhängig von der Fragmentlänge oder der Endkompatibilität wird hierbei die Fusionierung multipler DNA-Fragmente zu einem zirkulären Plasmid vollzogen. In dieser Arbeit wurde dieses Kit verwendet, um Plasmide zu konstruieren, welche sowohl für die Überproduktion von Genen, als auch für die Deletion von Genen in *P. vulgatus* dienen.

Zunächst erfolgte die Amplifizierung des Vektorrückgrats und der entsprechend zu klonierenden Genom-Sequenz, welche komplementäre Überhänge zum Vektor aufwies. Über diese wurde die Verknüpfung in der richtigen Orientierung bei der Assemblierung gewährleistet. Die dafür verwendeten Primer wurden mit Hilfe des NEBuilder® Assembly Tools erstellt. Die linearisierten Fragmente wurden dann durch den in Tabelle 13 gezeigten Reaktionsansatz zu einem Plasmid verbunden.

Tabelle 13: Zusammensetzung einer Assemblierungsreaktion unter Verwendung des NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mixes. Empfohlen wurde eine Vektor-Insert Verhältnis von 1:2.

Komponente	Menge
DNA-Fragment	x μ l (0,03 - 0,2 pmol)
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 μ l
rH ₂ O	Ad 20 μ l

Nach einem Aufreinigungsschritt der Amplifikate durch das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) wurde die Konzentration dieser am Nanodrop (Kapitel 2.4.3.) bestimmt. Die Assemblierung und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes erfolgten nach Vorschrift des Herstellers und die Inkubation des fertigen Ansatzes wurde für 15 min bei 50 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde das resultierende Plasmid für die Hitzeschocktransformation in *E. coli* eingesetzt, vervielfältigt und mittels Monarch® Plasmid Miniprep Kit (Tab. X) isoliert und sequenziert.

2.4.9. Sequenzierung von DNA

Zur Verifizierung der in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen, wurden klonierte Plasmide aus positiv selektierten Transformanten präpariert und zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) übermittelt. Dafür wurden 5 μ l Template DNA mit 5 μ l eines geeigneten Sequenzierungs-Primers (10 pmol/ μ l) gemischt.

2.4.10. Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Stämme

Die Übertragung ligierter Plasmide in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen erfolgte durch einen Hitzeschock. Durch diverse Modifikationen, wie beispielsweise den Knockout der *endA1*- und *recA1*-Nukleasen, wurde der Genotyp dieser Zellen für eine hohe Plasmid-Stabilität optimiert. Für die Transformation wurden 50 μ l kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l der in Kapitel 2.4.6.-2.4.8. dieser Arbeit beschriebenen Reaktionsansätzen versetzt. Nach einer 30 min Inkubation auf Eis folgte für 30 sec ein Hitzeschock bei 42 °C. Im Anschluss wurden die geschockten Zellen erneut für fünf Minuten auf Eis gelagert, mit 950 μ l SOC-Medium versetzt und für eine h bei 37 °C regeneriert. Zur Selektion positiver Transformanten wurden 100 μ l der regenerierten Zellen auf entsprechenden LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.11. Transformation von Plasmid-DNA in *P. vulgatus*

Die Transformation von Plasmid-DNA in *P. vulgatus* erfolge mittels Elektroporation oder durch biparentale Konjugation.

Für die Übertragung von Plasmid-DNA mittels Elektroporation wurde zunächst eine 50 ml Kultur von *P. vulgatus* über Nacht kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden unter Kühlung der Proben auf Eis und unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt. Die gesamte Kultur wurde bei 4 °C und 8.000 rpm in einem anaeroben Zentrifugenbecher pelletiert und zweimal mit kaltem, sterilen EP-Puffer (10 % Glycerol + 1 mM MgCl₂) gewaschen (8.000 rpm, 4 min). Anschließend wurde das Pellet in 500 µl EP-Puffer resuspendiert und 50 µl dieser Zellsuspension mit 5 µl des zu transformierenden Plasmids versetzt. 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 2,5 kV für sechs msec ausgesetzt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden 500 µl vorgewärmtes BHI-Medium in die Küvette gegeben und der gesamte Ansatz in Serumflaschen mit 2 ml BHI-Medium überführt. Die Regeneration erfolgte über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurden 50 µl der Regenerationskultur auf BHI-Agarplatten mit 100 µg/ml Erythromycin und 200 µg/ml Gentamycin ausplattiert und 48-72 h bei 37 °C anaerob kultiviert.

Für die Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation wurden als Donorstamm *E. coli* S17-1 DH5α λpir oder *E. coli* β2155 eingesetzt. Beide *E. coli*-Stämme haben die Konjugationsmaschinerie des Plasmids RP4 im Genom integriert, sodass eine biparentale Konjugation (ohne Helferstamm) ermöglicht wird. Zunächst wurden Kulturen des Rezipienten (*P. vulgatus*) und des Donors (*E. coli*) bis zu einer optischen Dichte von 0,3-0,6 angezogen. Anschließend wurden Rezipient und Donor in einem Zellzahlverhältnis von 1:3–1:10 (v/v) zusammengegeben. Dieser *mating*-Mix wurde pelletiert (10.000 rpm, 1 min), in 200 µl BHI-Medium resuspendiert, auf einen auf einer BHI-Agarplatte zentrierten Filter gegeben und über Nacht bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Filter in 2 ml BHI-Medium resuspendiert und 50 µl auf BHI-Agarplatten mit 100 µg/ml Erythromycin und 200 µg/ml Gentamycin ausplattiert. Es folgte eine Inkubation für 48-72 h unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

Die Aufnahme des Plasmids wurde bei beiden Transformationsmethoden mittels Kolonie-PCR (2.4.4.2.) überprüft.

2.4.12. Markerlose Deletion von Genen in *P. vulgatus*

Die Erstellung aller Deletionsvektoren erfolgte im Zuge dieser Arbeit unter Verwendung des NEBuilder HiFi DNA Assembly Kits (Kapitel 2.4.8.). Als Basis wurde der Vektor pMM656_SacB verwendet, welcher mit *sacB* als Gegenselektionsmarker eine markerlose Deletion erlaubte (zur Verfügung gestellt von André Neff, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn). Für die Assemblierung des Deletionsvektors wurden neben dem Vektorrückgrat (pMM656_SacB) 1000 bp große flankierende DNA-Fragmente *up-* und *downstream* des zu deletierenden Gens benötigt.

Die Transformation des Deletionsplasmids in *P. vulgatus* erfolgte durch biparentale Konjugation mit anschließender Selektion der Transformaten auf Erythromycin- und Gentamycin-haltigen BHI-Agarplatten. Da der Vektor in *P. vulgatus* nicht replizierbar ist, konnten nur Zellen auf den Antibiotika-haltigen Platten wachsen, welche das Konstrukt über homologe Rekombination der entsprechenden *up-* oder *downstream* Sequenz in das Genom integriert hatten. Mittels Kolonie-PCR (Kapitel 2.4.4.2.) wurden diese auf das im Vektorrückgrat codierte *sacB* überprüft. Klone, bei denen das entsprechende Fragment nachgewiesen wurde und damit eine erste homologe Rekombination durchgeführt hatten, wurden für den Vorgang der zweiten homologen Rekombination eingesetzt. Diese erfolgte ohne die Zugabe von Antibiotikum in BHI-Medium für 4 h bei 37 °C und anschließend durch eine Gegenselektion auf 150 mM Saccharose-haltigen PY-Agarplatten.

Saccharose diente in diesem System zur Gegenselektion, da es durch die heterolog produzierte Levansucrase (SacB) zu Levan umgesetzt wird. Eine intrazelluläre Akkumulation von Levan wirkt sich letal auf den Organismus aus. Somit konnten nur Zellen, welche im Zuge einer zweiten homologen Rekombination den Vektor aus dem Genom entfernen, auf entsprechenden Selektionsplatten überleben. Resultierend entstanden entweder Wildtyp-Revertanten oder unter Austausch des Zielgens, über die fusionierten Genflanken des Deletionsvektors, die gewünschte Mutante. Zum Nachweis einer möglichen Deletion wurden die auf Saccharose gewachsenen Klone mittels Kolonie-PCR auf den Verlust des entsprechenden Gens überprüft.

2.4.13. RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurden 2x2 ml einer exponentiell wachsenden Kultur des entsprechenden Stammes zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und die so pelletierten Zellen für die Aufbereitung durch das Monarch® Total RNA Miniprep Kits (Tab. 3) eingesetzt. Die Durchführung der Plasmid-Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.4.14. qPCR und RT-qPCR

Als quantitative PCR (qPCR), auch Echtzeit-PCR genannt, wird die tatsächliche Menge des in einem bestimmten Zyklus vorhandenen PCR-Produkts bestimmt.

Bei der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem man die relative Menge von mRNA eines Zielgens mit der eines konstitutiv exprimierten Referenzgens vergleichen kann. Hierfür wird zunächst isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, wonach eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt wird, die den entsprechend flankierenden Sequenzbereich der jeweiligen und nun umgeschriebenen mRNA amplifiziert.

Um die Amplifikation bei beiden Methoden sichtbar zu machen, enthalten die Ansätze einen Farbstoff, wie beispielsweise SYBR Green, welcher an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs bei einer bestimmten Wellenlänge zunimmt. Das messbare Fluoreszenzsignal korreliert damit direkt mit der Menge an enthaltener dsDNA, die in einer PCR mit jedem Zyklus exponentiell zunimmt. Schlussendlich lässt sich so auch die relative Ausgangsmenge an cDNA ermitteln, da der Zeitpunkt, an dem ein bestimmter Fluoreszenzwert bzw. Schwellenwert (*threshold*) detektiert wird, je nach Ausgangsmenge früher oder später stattfindet. Die Zykluszahl, bei welcher der *threshold* erreicht wird, bezeichnet man dabei als Ct-Wert, welcher am Anfang der linearen Phase der exponentiellen Amplifikationskurve angesiedelt ist. Je geringer der Ct-Wert, desto mehr mRNA eines Gens befand sich also vor der reversen Transkription in der Probe, während ein höherer Ct-Wert mit geringen Transkriptmengen gleichzusetzen ist.

In dieser Arbeit wurde die qPCR genutzt, um die relative Kopienzahl des *ldh* Gens (*bvu_2499*) in *P. vulgatus* Wildtyp, *P. vulgatus* pMM656_ldhnP und *P. vulgatus* pG106_ldhnP zu ermitteln. Hierfür wurden die entsprechenden Stämme über Nacht in BHI-Medium angezogen. Anschließend wurde jeder Kultur auf eine $OD_{600} = 0,5$ verdünnt und 1 ml der entsprechenden Suspension abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und in 1x PBS (8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g Na_2HPO_4 , 0,27 g KH_2PO_4 pro 1 l H_2O) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml nukleasefreiem Wasser resuspendiert und der Ansatz für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Das Zelllysate wurde verdünnt und mit dem Luna® Universal qPCR Master Mix (Tab. 3) versetzt. Die weitere Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

RT-qPCR wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Transkriptionsstatus überexprimierter Gene, sowie von kodierenden Genen der Enzyme des Pentosephosphatwegs aus *P. vulgatus* zu bestimmen. Hierfür wurde das Luna® Universal RT-qPCR Master Mix Kit (Tab. 3) nach Herstellerangaben verwendet.

Die experimentelle Durchführung der qPCR und RT-qPCR erfolgte in einem CFX Connect™ RT-PCR-Cycler von BioRad (München, Deutschland) und dem in Tabelle 14 aufgeführten PCR-Programm.

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für (RT)-qPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription *	55 °C	10 min
Initialdenaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	10 sec
Hybridisierung und Elongation	60 °C	30 sec
30x zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation		
Schmelzkurve	35 – 95 °C	Jeweils 5 sec

* nur bei RT-qPCR

Am Ende des Programms wurde optional eine Schmelzkurve der Amplifikate erstellt, wobei schrittweise die Temperatur erhöht und die Fluoreszenz der Ansätze gemessen wurde. Hierdurch konnte die Spezifität der Primer bzw. der Amplifikation bewertet werden, da distinkte PCR-Produkte einen charakteristischen Schmelzkurvenverlauf zeigen.

Die Ct-Werte wurden durch das zum Cycler gehörende *interface* automatisch ermittelt. Um hieraus die relative Transkriptabundanz eines Gens von Interesse zu bestimmen, wurden der Ct-Wert mit dem Ct-Wert des Referenzgens des ribosomalen Proteins L23, das unter wachsenden Bedingungen konstitutiv exprimiert wird, verrechnet (Gleichung 1 und 2).

Gleichung 1: $\Delta Ct = Ct - Ct_{\text{Referenzgen}}$

Gleichung 2: $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$

ΔCt stellt hierbei die Differenz zum Ct-Wert des Referenzgens dar, während $\Delta\Delta Ct$ das relative Verhältnis zur Transkriptmenge des Referenzgens angibt. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Reverse Transkriptase mit Primern für das Referenzgen.

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1. Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die heterologe Produktion rekombinanter Proteine wurden *E. coli*-Zellen mit entsprechendem Plasmid in einer LB-Vorkultur mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Eine 100 ml MI-Hauptkultur mit Ampicillin wurde 2,5 %-ig inokuliert und bis zu einer OD_{600} 0,3-0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Überproduktion durch Anhydrotetrazyklin (AHT; 200 ng/ml). Hierbei wird die Expression des klonierten Gens solange durch den *tet*-Repressor des pASK-IBA3/5 Vektor inhibiert, bis der *tet*-Promotor durch AHT induziert wird. Dabei bindet AHT an

den *tet*-Repressor und löst diesen von der DNA, sodass das Zielgen hinter dem *tet*-Promotor transkribiert werden kann. Für die optimale Proteinproduktion wurden die Kulturen über Nacht bei 18 °C und 100 rpm nach Induktion inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen bei 8,000 rpm für 10 min geerntet.

2.5.2. Zellaufschluss mittels Ultraschalls

Für den Aufschluss der Zellen wurde das Zellpellet der 100 ml Hautkultur (Kapitel 2.5.1.) in 10 ml Puffer W (Zusammensetzung Kapitel 2.5.3.) resuspendiert. Anschließend wurde pro 1 ml Kultur 2 min bei halbmaximaler Leistung mit gepulstem Ultraschall die Zellen bei 4° C aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) des Lysats wurden Zelltrümmer entfernt.

2.5.3. Proteinaufreinigung

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie angewendet. Grundlage dieser Methode ist die Interaktion zwischen dem künstlichen Oligopeptid „Strep-tag II“ (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK) und einem Streptactin-Säulenmaterial (immobilisiertes Strep-Tactin). Die nachfolgend beschriebene Durchführung erfolgte bei 4 °C. Klares Zelllysate wurde auf eine 50 %ige (v/v) Strep-Tactin-Sepharose-Säule (Strep-Tactin-®XT Superflow®; IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland; Säulenvolumen (CV) 1 ml) gegeben, welche zuvor mit 2 CV Puffer W äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit 5x1 CV Puffer W gewaschen. Durch die Zugabe von 6x0,5 ml CV Puffer BXT (1 x) wurde das Fusionsprotein schrittweise von der Säule eluiert. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 4 CV frisch angesetztem 10 mM NaOH gewaschen. Durch die abschließende Zugabe von 8 CV Puffer W wurde das NaOH entfernt und die Säule bei 4 °C gelagert. Die Elutionsfraktionen standen für nachfolgende Versuche zur Verfügung und wurden bei –20 °C gelagert.

Puffer W	100 mM Tris/HCl (pH 8)
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	100 mM Tris/HCl (pH 8)
Puffer BXT	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	50 mM Biotin

2.5.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Messung der Proteinkonzentration von Proteinlösungen wurde ein Bradford-Assay durchgeführt (Bradford 1976, modifiziert). Dieser basiert darauf, dass Coomassie Brilliant Blue G-250 eine Komplexbildung mit Arginin-, Lysin- und Histidinresten der Proteine in saurer Lösung eingeht. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Die Absorptionsintensität ist dabei proportional zur Proteinkonzentration. Durch den Vergleich mit einer Kalibriergeraden aus bekannten Proteinkonzentrationen kann somit der Proteingehalt einer Probe quantifiziert werden. 20 µl der entsprechenden Proben wurden hierfür mit 980 µl Bradford-Reagenz versetzt und für 10 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kalibrierkurve wurde mit Hilfe von Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen erstellt (0-1 mg/ml). Als Leerwert für die Messung der Absorption bei 595 nm diente Puffer BXT (Kapitel 2.5.3.).

2.5.5. Auftrennung und Visualisierung von Proteinen

2.5.5.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Eine Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen nach dem von Laemmli entwickelten diskontinuierlichen System (Laemmli, 1970). Hierbei enthält das diskontinuierliche Gel ein Trenn- und ein Sammelgel, deren Porengrößen durch die zugesetzte Acrylamid/Bisacrylamid Konzentration bestimmt werden. Das ionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS = *sodium dodecyl sulfate*) denaturiert und entfaltet die Proteine. Außerdem überdeckt es die Eigenladung der Proteine, sodass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen.

Die SDS-gebundenen Proteine wandern in einem elektrischen Feld in Richtung Anode und werden im Acrylamid/Bisacrylamid-Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zunächst durchlaufen die Proteine das Sammelgel (pH 6,8) und dann das Trenngel (pH 8,8). Das im Laufpuffer enthaltene Glycin (Folge-Ion) liegt bei dem neutralen pH-Wert des Sammelgels als Zwitterion vor und hat damit im Vergleich zum Chloridion (Leitron) eine geringere Nettoladung und damit auch eine geringe Mobilität, wodurch ein Spannungsfeld zwischen beiden Ionen entsteht. Die Proteine laufen in diesem Spannungsfeld gleich schnell und werden an der Front des Sammelgels auf diese Weise konzentriert. Beim Übertritt in das Trenngel wird Glycin negativ geladen und läuft den Proteinen voraus, sodass diese aufgrund der Porengröße des Acrylamid/Bisacrylamid-Gels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In

dem verwendeten diskontinuierlichen Gel betrug die Acrylkonzentration des Sammelgels 5 % und die des Trenngels 12,5 % (Zusammensetzung Tab. 15). Ammoniumpersulfat diente als Polymerisationsinitiator für die Gelbildung und TEMED fungierte als Katalysator der Reaktion. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben 1:1 mit Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Als Marker diente die PageRuler Prestained Protein Ladder (Kapitel 2.1.4.). Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelkammern. Dabei wurde für den Lauf durch das Sammelgel eine Spannung von 60 V und die Auftrennung durch das Trenngel eine Spannung von 100 V angelegt.

Trenngel-Puffer

Tris-Base 22,77 g
 rH₂O Ad 100 ml
 pH-Wert auf 8,8 eingestellt durch HCl-Zugabe

1 x Elektrodenpuffer

Tris-Base 3 g
 Glycin 14,4 g
 SDS 1 g
 rH₂O Ad 1000 ml
 pH-Wert auf 8,3 eingestellt durch HCl-Zugabe

Ladepuffer

Sammelgel-Puffer 2 ml
 2-Mercaptoethanol 0,5 ml
 1 % Bromphenolblau 0,1 ml
 Glycin 5 ml
 rH₂O Ad 10 ml

10 % APS-Lösung

Ammoniumpersulfat 0,1 g
 rH₂O Ad 1 ml

0,5 % SDS-Lösung

SDS 0,5 g
 rH₂O Ad 100 ml

Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Komponente	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (5 %)
Rotiphorese® Gel 40	2 ml	250 µl
Trenngel-Puffer	1,2 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	400 µl
SDS-Lösung	1,2 ml	400 µl

rH ₂ O	1,6 ml	950 µl
TEMED	5 µl	5 µl
APS	30 µl	30 µl

2.5.5.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) ist eine Methode zum Färben der aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bereits im ng-Bereich, weshalb es sich hierbei um eine sehr sensitive Methode handelt. Für die Färbung wurde das SDS-Gel zunächst für 20 min in Fixierlösung zur Präzipitation der Proteine inkubiert und anschließend 10 min mit 50 % Methanol überschichtet. Es folgte ein Waschen des Gels für 10 min mit rH₂O, sowie eine Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung zur Sensitivitäts- und Kontrasterhöhung. Nach zwei weiteren Waschschritten für 1 min mit rH₂O wurde die Imprägnierung des Gels für 20 min im Dunkeln bei 4 °C mit Imprägnierlösung durchgeführt. Durch die Inkubation mit Silbernitrat lagern sich die Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine an. Anschließend wurde das Gel mit Entwicklerlösung überschichtet, um eine Reduzierung der Silberionen zu elementarem Silber durch Formaldehyd zu ermöglichen. Die Reaktion wurde mit Stopplösung gestoppt und das Ergebnis fotografisch festgehalten.

Fixier-Lösung

Methanol	500 ml
Essigsäure (100 %)	120 ml
Formaldehyd (37%)	0,5 ml
rH ₂ O	Ad 1000 ml
pH-Wert auf 8,3 eingestellt durch HCl-Zugabe	

50 % Methanol

Methanol	25 ml
rH ₂ O	Ad 50 ml

Thiosulfat-Lösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,01 g
rH ₂ O	Ad 50 ml

Imprägnier-Lösung

AgNO ₃	0,05 g
rH ₂ O	Ad 50 ml

Imprägnier-Lösung

Na ₂ CO ₃	1,5 g
Formaldehyd (37 %)	0,050 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,004 ml
rH ₂ O	Ad 50 ml

Stopp-Lösung

Essigsäure	2,5 ml
rH ₂ O	Ad 50 ml

2.5.5.3. Westernblot

Eine weitere Methode zur Visualisierung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine ist das Western Blotting (Towbin *et al.*, 1979). Hierzu werden die Proteine zunächst im elektrischen Feld von einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend erfolgt eine Visualisierung der Proteine durch Zugabe eines Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpers, dessen Epitop der Strep-tag der rekombinanten und auf der Membran immobilisierten Proteine ist. Grundlage dafür ist die Umwandlung des Chromogens 4-Chloro-1-naphthol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zum farbigen Oxidationsprodukt 4-Chloro-1-naphthol.

Durch das Semidry-Blot-Verfahren wurden die Proteine für 30 min bei einer Spannung von 15 V auf eine Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad, München, Deutschland) transferiert. Ober- und unterhalb des Gels bzw. der Membran wurden 3 Whatman-Paper platziert, welche zuvor in Towbin-Puffer äquilibriert wurden. Im Anschluss an den Transfer der Proteine wurde die Membran über Nacht bei Raumtemperatur in 20 ml PBS-Blockier-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und somit mögliche Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	0,256 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml
pH-Wert auf 7,4 eingestellt	

BS-Blockier-Lösung

PBS-Puffer mit 0,5 % (v/v) Tween 20 und 5 % (w/v) Milchpulver

Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 5 min in 20 ml PBS-Tween-Puffer und eine Inkubation für 1 h in 20 ml PBS-Tweenpuffer, welcher 5 µl des Strep-Tactin-Meerrettichperoxidase-Konjugats (IBA Lifesciences; Göttingen, Deutschland) enthielt. Es folgten zwei Waschschriffe mit 20 ml PBST-Puffer, sowie zwei weitere Waschschriffe mit 20 ml PBS-Puffer für jeweils 1 min. Für die Ausbildung einer Farbreaktion wurde die Membran in 20 ml PBS-Puffer gegeben, dem 20 µl Wasserstoffperoxid-Lösung

und 200 µl Chromogen-Lösung beigelegt wurden. Bis zum Auftreten sichtbarer Banden wurde die Färbung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur durchgeführt.

PBS-Tween-Puffer

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

Chloronaphthol-Lösung

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

Wasserstoffperoxid

30 % (v/v) H₂O₂

2.5.6. Luciferase Assay

Zur Bewertung der Funktionalität von pMM656 in *P. vulgatus* wurde das auf dem integrierten Vektor kodierte Luciferase-Reportersystem verwendet. Zunächst wurden 200 µl von *P. vulgatus* in einer 96-well Platte mit verschiedenen Konzentrationen von Rhamnose (0-4 mM) über Nacht bei 37 °C in einem Infinite 200 PRO NanoQuant Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Rhamnose induzierte in diesem Zusammenhang den Promotor PRhaKIPAO, sodass das dahinterliegende Gen *nanoluc* exprimiert wurde. Anschließend wurde die Kulturen durch Zugabe von 20 µl PopCulture-Reagenz und Lysozym (160 U) lysiert (EMD Millipore, Darmstadt, Deutschland). Der NanoLuc®-Luciferase Assay (Promega, Walldorf, Deutschland) wurde gemäß den Herstellerangaben mit 10 µl *P. vulgatus* Zelllysate und 10 µl NanoLuc-Reaktionspuffer mit dem Substrat Furimazin durchgeführt. Das produzierte Enzym NanoLuc oxidiert Furimazin und erzeugt somit Biolumineszenz (Emax = 460 nm) mit einer Halbwertszeit von 2 h, sodass die Aktivität der Luciferase mit einer Integrationszeit von 1 sec in einem Infinite 200 PRO NanoQuant Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) unter aeroben Bedingungen gemessen werden konnte. Die entsprechenden relativen Lichteinheiten (RLU) wurden auf OD1 normalisiert.

2.6. Analytische Methoden

2.6.1. Quantifizierung von Wasserstoff durch Gaschromatograph

Zur Quantifizierung des von *P. vulgatus* produzierten Wasserstoffs, wurde die Gasphase mehrerer Kulturen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase untersucht. Von dem entnommenen Gasvolumen wurden 100 µl in einen Gaschromatographen (Shimadzu GC-14A; Shimadzu, Duisburg, Deutschland) mit einer Chromosorbssäule (Agilent Chromosorb 101, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) injiziert. Die Säulentemperatur betrug hierbei 100 °C und die Injektor- und Detektortemperatur

120 °C. Argon wurde als Trägergas eingesetzt. Die Wasserstoffkonzentration der Gasphase wurde durch Korrelation mit einer Wasserstoff-Standardkurve berechnet.

2.6.2. Quantifizierung von Stoffwechselendprodukten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatograph

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen. Der zu untersuchende Stoff wird mittels eines Laufmittels (mobile Phase) über eine Trennsäule (stationäre Phase) geleitet. Die Wechselwirkung des Analyten mit der stationären bzw. mobilen Phase bestimmt dabei dessen Elutionszeit.

In dieser Arbeit wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Phase der Kulturüberstand mittels HPLC analysiert. Dafür wurde der Kulturüberstand 1:3 mit 5 mM H₂SO₄ verdünnt eingesetzt und mit Hilfe einer Aminex HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule (Biorad, München, Deutschland) und 5 mM H₂SO₄ (mobile Phase) bei 65 °C durchgeführt. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min. Die Bio-Rad Aminex HPX-87H Säule ist grundsätzlich für die Analyse von Mono- bis Disacchariden und organische Säuren ausgelegt. Die stationäre Phase besteht aus negativ geladenem Material, an das die Substanzen in der Probe binden. Je nach Stärke der positiven Ladung der Substanzen werden diese nach unterschiedlichen Zeiten durch das Laufmittel verdrängt. Die Detektion, sowie Quantifizierung der Substanzen erfolgte über den Brechungsindex-Detektor (RI) und Bestimmung der Konzentrationen von Substratverbrauch und Produktbildung erfolgte mit Hilfe von Standardsubstanzen.

2.7. Photometrische Messungen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

In dieser Arbeit wurden über photometrische Messungen die Aktivitäten verschiedener Enzyme in aufgereinigter Form und in zellfreiem Extrakt charakterisiert. Dabei wurde vor allem untersucht, ob die Enzyme die bioinformatisch hervorgesagte Reaktion katalysierten und welche Reaktionsgeschwindigkeit dabei vorlag. Die enzymatische Aktivitätsbestimmung erfolgte photometrisch über die Absorptionsänderung eines Substrats (NADH/NAD⁺ und NADPH/NADP⁺) während der Reaktion, sodass über die Änderung der Absorption pro min ($\Delta E/\text{min}$) die Enzymgeschwindigkeit und die Menge der umgesetzten Substratmoleküle ($\mu\text{mol}/\text{min}$) bestimmt werden konnte.

2.7.1. Charakterisierung der Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) aus *P. vulgaris*

Die Aktivität der D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) von *P. vulgaris* (BVU_2499) wurde mittels Absorptionsänderung von NADH/NAD⁺ bei einer Wellenlänge von 340nm photometrisch bestimmt. Für eine allgemeine Bestimmung der Aktivität der heterolog produzierten LDH wurde der in Tabelle 16 aufgeführte Ansatz verwendet. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats Pyruvat gestartet.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Ansatzes zur Bestimmung der Enzymaktivität der heterolog produzierten LDH (BVU_2499).

Komponente	End-Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer pH 7	100 mM
NADH	250 µM
Pyruvat	5 mM
LDH (aufgereinigt)	5 µg
rH ₂ O	Ad 1 ml

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde bei einer konstanten Temperatur von 37 °C die Reaktion gemessen. Der eingesetzte Puffer variierte zwischen einem pH von 4-9. Dabei wurde ein kombiniertes Puffersystem aus Na-Acetat, Tris-HCl, Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat (jeweils 50 mM) eingesetzt. Bei der Ermittlung des Temperatur-Optimums wurde Tris-HCl Puffer pH 8 verwendet und ein Temperaturbereich von 30-80 °C abgedeckt.

Mit Hilfe der Absorptionsänderung pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) und dem Lambert-Beerschen-Gesetz wurde die spezifische Aktivität [U/mg] berechnet (Formel 4). Neben der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität, wurde auch die Affinität des Enzyms für das Substrat (K_M -Wert) mittels Michaelis-Menten-Kinetik-Plot ermittelt. Hierfür blieb die eingesetzte Enzymmenge konstant und die Menge des Substrats (0-50 mM) wurde variiert.

Sofern nicht anders angegeben, werden in dieser Arbeit spezifische Aktivitäten in Units (U) ausgedrückt, wobei 1 U der Umsetzung von 1 µmol Substrat pro min entspricht. Die Volumenaktivität [U/mg] innerhalb eines Reaktionsansatzes wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet und ist in Formel 3 dargestellt.

Formel 3: Berechnung der Volumenaktivität [U/ml].

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E}{\varepsilon * d} * \frac{\text{Testvolumen}}{\text{Enzymvolumen}}$$

$\Delta E/\text{min}$: Absorptionsabnahme pro min

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ϵ : Extinktionskoeffizient 340nm ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde der Wert der Volumenaktivität durch die mittels Bradford ermittelte Proteinkonzentration dividiert, sodass die Aktivität die Umsetzung von 1 μmol Substrat pro min und mg Enzym beschreibt [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$].

Formel 4: Berechnung der spezifischen Aktivität [U/mg].

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{U}{\text{mg}} \right] = \frac{U/\text{ml}}{c \text{ (Enzym) in mg/ml}}$$

2.7.2. Bestimmung der Enzymaktivität von BVU_2499 in zellfreiem Extrakt

Zur Untersuchung der spezifischen Aktivität der D-LDH in zellfreiem Extrakt wurden *P. vulgatus* Kulturen (Wildtyp, pMM656_ldhnP und pG106_ldhnP) in 50 ml BHI kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet (10.000 rpm, 15 min, 4°C) und das Pellet in 10 ml Puffer W (Kapitel 2.5.3.) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschalles (30 min bei halbmaximaler Leistung) lysiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (8000 rpm, 15 min, 4°C) entfernt. Die Proteinkonzentration wurde, wie in Kapitel 2.5.4. beschrieben, bestimmt. Die spezifische Aktivität, so wie die Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums, als auch die des K_M -Werts, wurden, wie in Kapitel 2.7.1. beschrieben, durchgeführt.

2.7.3. Bestimmung der Enzymaktivität des LUT-Systems

In dieser Arbeit wurde mit Membranfraktionen von *P. vulgatus* eine mögliche Aktivität der Enzyme des LUT-Systems untersucht. Generell wurde dieselbe Messmethode der Aktivitätsbestimmung der cytoplasmatischen D-LDH (Kapitel 2.7.1.) verwendet. Dabei wurde anstelle der aufgereinigten D-LDH 100 μg Membranfraktion eingesetzt (Tabelle 17). Zur Untersuchung der generellen Funktionalität der Membranpräparation wurde die kombinierte Aktivität der Membrankomplexe Nqr und Fumarat-Reduktase durch die Übertragung der Elektronen von NADH auf Fumarat bei einer Wellenlänge von 340nm gemessen.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Ansatzes zur Bestimmung der Enzymaktivität des LUT-Systems.

Komponente	End-Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer pH 7	40 mM
NADH/NAD ⁺	250 µM
Pyruvat/Lactat/Fumarat	5 mM
Membranfraktion	100 µg
rH ₂ O	Ad 1 ml

Zusätzlich wurde untersucht, ob Methylviologen (MV) als alternativer Elektronenakzeptor in Kombination mit Pyruvat als Substrat zur Bildung von Lactat diene. MV besitzt im reduzierten Zustand eine blaue Färbung, die bei einer Wellenlänge von 604nm gemessen werden kann. Im oxidierten Zustand ist MV farblos. Eine Abnahme der Absorption bei 604nm gibt demnach direkt Rückschluss darauf, ob MV_{red} in einem enzymatischen Test oxidiert werden kann. Für den Nachweis, ob MV_{red} als alternativer Elektronenakzeptor für die Reduktion von Pyruvat diene, wurden 2,5 mM MV_{ox} mit Titan(III)-Citrat reduziert, bis eine Absorption (A_{604}) von etwa 1,5 erreicht war. Danach wurden 100 µg Membranfraktion hinzugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 5 mM Pyruvat, welches als potentieller Elektronenakzeptor der Reaktion diene.

2.7.4. Bestimmung der Aktivität von Enzymen des oxidativen Pentosephosphatwegs

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, BVU_2796) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH, BVU_2795) des oxidativen Astes des Pentosephosphatweges aus *P. vulgatus* wurde mittels Absorptionsänderung von NADPH/NADP⁺ bzw. NADH/NAD⁺ bei einer Wellenlänge von 340nm photometrisch bestimmt. Hierbei lag das Hauptaugenmerk darauf, ob die Enzyme NADP⁺ oder NAD⁺ als Substrat verwendeten. Für die Ermittlung der Affinität des Enzyms zum entsprechenden Substrat (K_M -Wert) blieb die eingesetzte Enzymmenge konstant und die Menge von NADP⁺/NAD⁺ (0-8 mM) wurde variiert (Tabelle 18).

Tabelle 18: Zusammensetzung des Ansatzes zur Bestimmung des K_M -Wertes der heterolog produzierten G6PDH/6PGDH zum Substrat NADP⁺/NAD⁺.

Komponente	End-Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer pH 7	100 mM
NADP ⁺ /NAD ⁺	x µM
Glucose-6-Phosphat/6-Phosphogluconat	5 mM

G6PDH/6PGDH (aufgereinigt)	5 µg
rH ₂ O	Ad 1 ml

2.7.5. Nachweis von Formiat im Kulturüberstand über eine Formiat-Dehydrogenase

Der Nachweis von Formiat im Überstand von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* Δ2880 erfolgte über die Umsetzung von Formiat im Überstand der Kulturen durch eine kommerziell erworbene Formiat-Dehydrogenase (Tabelle 1). Die enzymatische Reaktion wurde über die Absorptionsänderung von NADH/NAD⁺ bei einer Wellenlänge von 340nm verfolgt. In Tabelle 19 ist der verwendete Reaktionsansatz aufgelistet.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Ansatzes zum Nachweis von Formiat im Kulturüberstand.

Komponente	End-Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer pH 7	100 mM
NAD ⁺	250 µM
Kulturüberstand	100 µl
Formiat-Dehydrogenase	0,5 U
rH ₂ O	Ad 1 ml

3. Ergebnisse

Succinat ist eine der am meisten produzierten Plattformchemikalien weltweit. Als Salz der Bernsteinsäure ist diese Verbindung Bestandteil vieler Produkte der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie (Saxena *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018). Hierbei findet Succinat vor allem Anwendung in der Herstellung von Detergenzien, Kosmetika, Lebensmittelzusatzstoffen und dem Kunststoff Polybutylen-Succinat (PBS) (Nghiem *et al.*, 2017, Dessie *et al.*, 2018, Kumar *et al.*, 2020). Die aktuelle Klimadebatte und die steigenden Ölpreise fördern den Umstieg der traditionell petrochemisch-basierten Succinat-Herstellung hin zu umweltfreundlichen, biotechnologischen Produktionswegen (Dessie *et al.*, 2018; Nasser *et al.*, 2021). Im Fokus dessen steht die fermentative Produktion von Succinat, basierend auf nachwachsenden Rohstoffen. Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* zählen zu den häufigsten xylanolytischen Mikroorganismen der humanen Darmflora und sind dazu befähigt, eine Vielzahl pflanzlicher Polysaccharide zu verwerten (Dehority, 1966; Chassard *et al.*, 2007). Durch die Verstoffwechslung entsprechender Verbindungen produzieren Arten dieser Gattungen auf natürliche Weise Succinat, wodurch auch *P. vulgatus* einen geeigneten Kandidaten für die Anwendung einer nachhaltigen Bio-Succinat-Herstellung darstellt.

Bisher wurden Bacteroidota-Spezies, *P. vulgatus* eingeschlossen, für biotechnologische Verfahren zur effizienten und nachhaltigen Produktion von Succinat noch nicht eingesetzt. Im Allgemeinen ist für die Produktion von Plattformchemikalien im industriellen Maßstab eine genetische Manipulation des Stoffwechsels der eingesetzten Organismen notwendig. Dies beinhaltet unter anderem die Überexpression von Genen, wodurch der Kohlenstofffluss gezielt in die Richtung der Synthese des gewünschten Produkts gelenkt werden kann. Durch die Deletion von Genen können kompetitive Stoffwechselwege unterbrochen und die Produktion von Nebenprodukten unterbunden werden. Für eine Manipulation des Stoffwechsels muss der entsprechende Organismus generell genetisch zugänglich sein, sodass das Einbringen von rekombinanter DNA in die Zelle, sowie die Deletion chromosomaler Gene, umsetzbar ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines genetischen Systems zur Anwendung in *P. vulgatus*. Durch homologe Genexpression, als auch durch die Deletion von Genen, sollte der Stoffwechsel des Organismus gezielt manipuliert und das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte zu Gunsten von Succinat verschoben werden.

3.1. Entwicklung eines Systems zur gezielten genetischen Manipulation von *P. vulgatus*

3.1.1. Transfer des genomintegrativen Vektors pMM656

Um die genetische Zugänglichkeit von *P. vulgatus* zu testen, musste zunächst ein geeignetes Plasmidsystem ausgemacht werden. Hierfür wurde das System von Mimeo *et al.* (2015) verwendet, das auf dem Plasmid pMM656 (Abb. 3) basiert und erstmals in *B. thetaiotaomicron* angewendet wurde. Hierbei vermittelt eine auf dem Plasmid kodierte Integrase (IntN2; NBU2 Integrase) die sequenzspezifische Rekombination zwischen der attN2-site auf dem Plasmid und einer der beiden attN-sites, welche sich am 3'-Ende der beiden für tRNA^{Ser} kodierenden Gene auf dem Chromosom befinden (Wang *et al.*, 2000; Abb. 3). Neben einer Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion der Transformanden, kodiert pMM656 eine Erythromycin-Resistenzkassette, welche, wie auch die stromaufwärts gelegene Promotorstruktur, aus *B. thetaiotaomicron* stammt und zur Selektion von Spezies der Ordnung *Bacteroidales* eingesetzt wird (Mimeo *et al.*, 2015). Für die Vervielfältigung des Vektors in einem geeigneten *E. coli*-Stamm (*E. coli* λpir) kodiert pMM656 einen R6K-OriV, wohingegen der RP4-OriT dem konjugativen Transfer dient (Abb. 3).

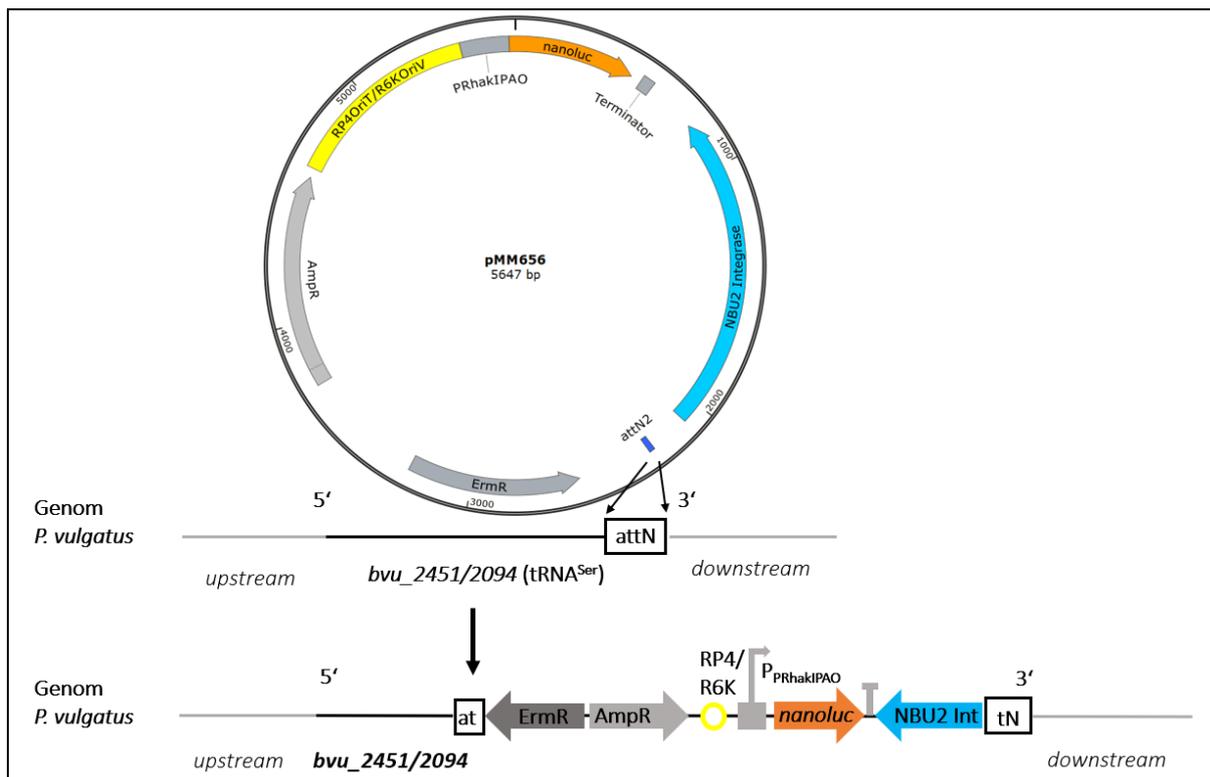


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Integration von pMM656 in das Genom von *P. vulgatus*. Die Integration des Plasmids pMM656 in das Genom des Organismus wird durch die Integrase NBU2 vermittelt, welche eine genspezifische Rekombination zwischen der attN2-site auf dem Plasmid und der attN-site am 3'-Ende eines der für tRNA^{Ser} kodierenden Gene im Genom katalysiert. AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette; ErmR = Erythromycin-Resistenzkassette; R6K OriV = *origin of replication*; RP4 OriT = *origin of transfer*; nanoluc = NanoLuc-Luciferase kodierendes Gen; PRhaKIPAO (P_{PRhaKIPAO}) = Rhamnose induzierbarer Promotor.

Da der R6K-OriV nur für die Replikation von *E. coli* genutzt werden kann und kein entsprechender OriV für Spezies der Ordnung *Bacteroidales* kodiert wird, handelt es sich bei pMM656 um einen *suicide*-Vektor, welcher unter Selektionsdruck in das Genom der Organismen integriert wird. Für eine Anwendung dieses Systems in *P. vulgatus* wurde zunächst überprüft, ob die entsprechenden attN-sites aus *B. thetaiotaomicron* (*bt_t70* und *bt_t71*) auch im Genom von *P. vulgatus* kodiert werden. Durch ein Sequenz-Alignment konnte bestätigt werden, dass die Gene *bvu_2451* und *bvu_2094* aus *P. vulgatus* eine Homologie zu den aus *B. thetaiotaomicron* entsprechenden tRNA^{Ser} kodierenden Genen *bt_t70* und *bt_t71* aufzeigen (Abb. 4). Für die Rekombination sind vor allem zwei spezifische Sequenzbereiche essenziell (Abb. 4, grau und gelb markiert; siehe Kapitel 4.1).

<i>bt_t70</i>	ggagaggtggcagagtggcgcgattgcggcggctctgaaaaccggtgtactgcgaggtacc	60
<i>bvu_2451</i>	ggagaggtggcagagtggcgcgattgcggcggctctgaaaaccggtgtactgcgaggtacc	60

<i>bt_t70</i>	cggggttcgaatc cctgtctctccgc	85
<i>bvu_2451</i>	cggggttcgaatc cctgtctctccgc	85

<i>bt_t71</i>	ggagaggtggcagagtggcgcgattgcggcggctctgaaaaccggtgtaccgcgaggtacc	60
<i>bvu_2094</i>	ggagaggtggcagagtggcgcgattgcggcggctctgaaaaccggtgtaccgcgaggtacc	60

<i>bt_t71</i>	cggggttcgaatc cctgtctctccgc	85
<i>bvu_2094</i>	cggggttcgaatc cctgtctctccgc	85

Abbildung 4: Sequenz-Alignment der tRNA^{Ser} kodierenden Gene aus *B. thetaiotaomicron* (*bt_t70* und *bt_t71*) und *P. vulgatus* (*bvu_2451* und *bvu_2094*). *Bvu_2451* weist eine Homologie zu *bt_t70* auf und *bvu_2094* zu *bt_t71*. Für die Rekombination wichtige Sequenzbereiche sind in grau und gelb markiert.

Da beide für tRNA^{Ser} kodierenden Gene auch in *P. vulgatus* konserviert waren und somit die Integration des Plasmidrückgrats in das Genom des Organismus gewährleistet sein würde, sollte der Transfer von pMM656 in *P. vulgatus* zunächst durch biparentale Konjugation erfolgen. Hierbei diene *E. coli* λpir S17-1 pMM656 als Donorstamm. Zur Selektion von *P. vulgatus* wurde Erythromycin (100 µg/ml) eingesetzt und zur Gegenselektion von *E. coli* diene Gentamycin (200 µg/ml). Nach 48 h konnten auf den selektiven Agarplatten vereinzelt Kolonien ausgemacht werden, welche für eine Kolonie-PCR eingesetzt wurden.

Durch die Verwendung der Oligonukleotide screen_ermR_for und pMM656_tetR_screening_rev (Tab. 7) erfolgte der Nachweis der auf dem Plasmid kodierten Erythromycin-Resistenzkassette. Das erwartete Fragment besaß eine Größe von 490 bp und konnte mittels Gelelektrophorese bestätigt

werden (Abb. 5, Spur 3). Weiterhin konnte die Integration des Plasmidrückgrats in das Genom des Organismus unter Verwendung des Primerpaars attB_for und attB_inErm_rev (Tab. 7) nachgewiesen werden. Der *forward*-Primer band hierbei im Genom von *P. vulgatus* (*bvu_2451/bvu_2094*), während der *reverse*-Primer zur Erythromycin-Resistenzkassette auf dem Plasmidrückgrat homolog war, sodass eine Fragmentgröße von 680 bp amplifiziert wurde (Abb. 5, Spur 4). Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung dieser Kolonien mit für *P. vulgatus* 16S rRNA genspezifischen Oligonukleotiden. Um auszuschließen, dass es sich bei den gewachsenen Kolonien um den Donorstamm handelte, wurden ebenso Primer eingesetzt, welche einen für *E. coli* charakteristischen Bereich des 16S rRNA kodierenden Gens flankierten. Hierbei wurde nur eine Bandengröße von 200 bp entsprechend der 16S rRNA von *P. vulgatus*, aber nicht der von *E. coli* amplifiziert (Abb. 5, Spur 1 und 2). Demnach konnte bestätigt werden, dass das Plasmid pMM656 in *P. vulgatus* transferiert wurde und eine Rekombination der attN2-*site* auf dem Plasmid und einer der beiden attN-*sites*, welche sich am 3'-Ende der beiden für tRNA^{Ser} kodierenden Gene auf dem Chromosom von *P. vulgatus* befinden, stattfand.

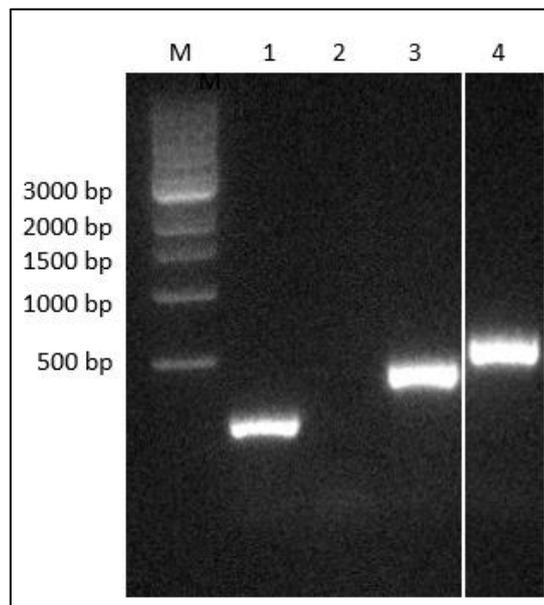


Abbildung 5: Nachweis des Transfers und der Integration von pMM656 in das Genom von *P. vulgatus*. Dargestellt ist das Ergebnis der Kolonie-PCR mit dem Nachweis der 16S rRNA genspezifischen Bereiche von *P. vulgatus* (Spur 1) und *E. coli* (Spur 2), sowie der Erythromycin-Resistenzkassette von pMM656 (Spur 3). Spur 4 zeigt das PCR-Fragment, welches der Integrationsstelle von pMM656 in das Genom von *P. vulgatus* entspricht. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Die Integration des Vektors in das Genom des Organismus inaktiviert die entsprechende tRNA^{Ser}, sodass eine doppelte Insertion aufgrund der Bedeutung der tRNA^{Ser} unwahrscheinlich ist. Demnach sollte als Nächstes untersucht werden, in welches der beiden Gene von *P. vulgatus* (*bvu_2451* oder *bvu_2094*) das Plasmid integrierte. Zum Nachweis dessen wurden die Oligonukleotide attB2451_for/attB2094_for und attB_inErm_rev (Tab. 7) eingesetzt. Wie zuvor band hierbei der

reverse-Primer in der Erythromycin-Resistenzkassette auf dem Vektorrückgrat, während sich der jeweilige *forward*-Primer stromaufwärts der untereinander hochkonservierten tRNA^{Ser} Gene *bvu_2451* und *bvu_2094* anlagerte. Dadurch war jeweils eine Fragmentgröße von 1021 bp zu erwarten. Die entsprechende Bandengröße wurde nur unter Verwendung des *forward*-Primers attB2094_for amplifiziert, sodass nachgewiesen wurde, dass das Plasmid am 3' Ende des Gens *bvu_2094* im Genom von *P. vulgatus* integrierte (Abb. 6, Spur 2).

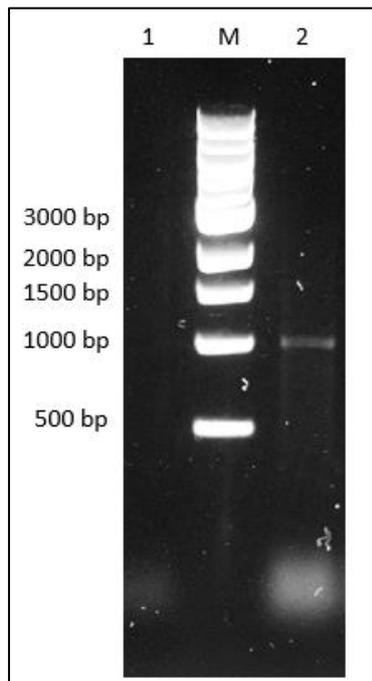


Abbildung 6: Nachweis der genomischen Integration von pMM656 in das Gen *bvu_2094* von *P. vulgatus*. Die Integration erfolgte durch die sequenzspezifische Rekombination zwischen der attN2-site auf dem Plasmid und der attN-site am 3'-Ende des tRNA^{Ser} kodierenden Gens *bvu_2094* (Spur 2) aus *P. vulgatus*. Die Oligonukleotide attB2451_for/attB2094_for und attB_inErm_rev wurden für den Nachweis der Integration eingesetzt, wobei der entsprechende *forward*-Primer im Genom und der *reverse*-Primer auf dem Plasmidrückgrat bindet. Spur 1= tRNA^{Ser} kodierendes Gen *bvu_2451*. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Mit dem Ziel einer homologen Überexpression von Genen in *P. vulgatus* musste zunächst die Funktionalität des Plasmids pMM656 im Organismus überprüft werden. Der Vektor pMM656 kodiert das Gen *nanoluc* (Abb. 3), sodass dieses als Luciferase-Reportersystem verwendet werden konnte. Die NanoLuc Luciferase katalysiert unter Sauerstoffeinfluss die Umwandlung des Substrats Furimazin zu Furimamid mit einhergehender Lumineszenzbildung (England *et al.*, 2016). Im Vergleich zu anderen Luciferase-Reportersystemen ist diese Reaktion ATP-unabhängig.

Die Expression des Gens *nanoluc* steht unter Kontrolle der stromaufwärts gelegenen Promotor-RBS-Region (pRhaKIPAO) des Rhamnose-Kinase-Gens (*bt_3763*) aus *B. thetaiotaomicron* (Mimee *et al.*, 2015), sodass die Genexpression von *nanoluc* Rhamnose abhängig ist. Demnach wurden zur Bildung der NanoLuc-Luciferase in *P. vulgatus* unterschiedliche Konzentrationen an Rhamnose (0-4 mM) zum

Medium supplementiert. Es zeigte sich, dass zwischen 0,4–4 mM ansteigender Rhamnose-Konzentrationen die Expression des Gens *nanoluc* zunehmend induziert wurde und somit eine stetig fortlaufende Lumineszenz detektiert werden konnte. Ab einer Konzentration von 4 mM schien die maximale Expression erreicht zu sein, da bei einer Konzentration von 5 mM Rhamnose keine deutliche Steigerung der Lumineszenz im Vergleich zu der bei 4 mM eingesetzter Rhamnose detektiert wurde (Abb. 7 A). Ohne den Zusatz von Rhamnose konnte keinerlei Lumineszenz nachgewiesen werden, sodass schlussfolgernd unter Ausschluss dieses Induktors das Gen *nanoluc* nicht transkribiert wurde (Abb. 7 A).

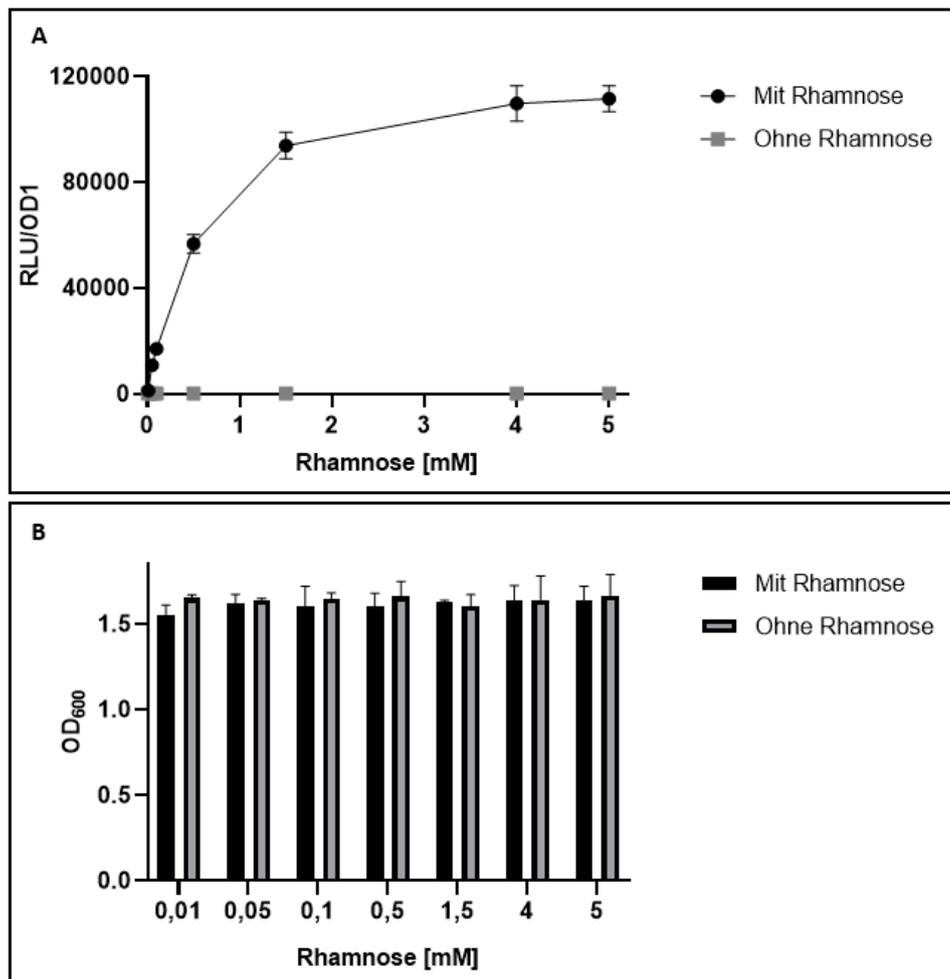


Abbildung 7: NanoLuc-Aktivität unter Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors und maximale OD₆₀₀ mit und ohne den Zusatz von Rhamnose. (A) *P. vulgatus* pMM656 Zellen wurden für 24 h bei 37° C ohne und mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen (0-4 Mm) inkubiert. Nach der Lyse wurde das Zelllysate gemäß den Herstellerangaben des NanoLuc®-Luciferase Assay behandelt. *Relative light units* (RLU) wurden auf OD1 normalisiert. (B) Dargestellt ist die maximal erreichte OD₆₀₀ nach der Kultivierung ohne und mit dem Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an Rhamnose. Die Experimente wurden viermal durchgeführt und die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben.

Sowohl die Ansätze mit steigender Rhamnose-Konzentration, als auch die ohne Rhamnose, erreichten alle eine OD₆₀₀ von etwa 1,5 (Abb. 7 B). Somit konnte eine Wachstumslimitierung durch die Bildung

der NanoLuc-Luciferase, unabhängig von der Konzentration, ausgeschlossen werden. Ebenso konnte bestätigt werden, dass das Plasmid pMM656 in *P. vulgatus* funktionstüchtig war und somit für eine gezielte Überexpression von Genen verwendet werden könnte.

3.1.2. Transfer des *shuttle*-Vektors pG106

Neben dem von Mimeo *et al.* (2015) entwickelten Integrationsvektor wurde auch ein von Jones *et al.* (2020) entwickeltes System für die Etablierung eines genetischen Systems in *P. vulgatus* verwendet.

Als Grundlage dafür diente der *shuttle*-Vektor pG106 (Jones *et al.*, 2020). Dieser Vektor umfasst eine 5 kb große Mob-Rep-Region, welche als OriV für die Initiation der Plasmidreplikation in *Bacteroidales*-Spezies Anwendung findet (Abb. 8 B). Dieser Vektor kodiert zudem eine hybride ErmF-ErmAM-Resistenzkassette, welche sowohl die Selektion von *E. coli* (ErmAM), als auch von *Bacteroidales*-Spezies (ErmF) ermöglicht (Fletcher *et al.*, 1995). Aufgrund des für *Bacteroidales*-Spezies eigenen Replikationsursprungs, sollte dieser *shuttle*-Vektor in *P. vulgatus* replizierbar sein und sich für eine homologe Genexpression eignen. Demnach wurde zunächst untersucht, ob der Vektor pG106 von *P. vulgatus* aufgenommen und repliziert wird. Mittels Elektroporation sollte das Plasmid in den Organismus transferiert werden. Nach 48 h konnten auf den Selektiv-Agarplatten (100 µg/ml Erythromycin) Kolonien nachgewiesen werden. Diese wurden in eine Kolonie-PCR eingesetzt. Für den Nachweis der Erythromycin-Resistenzkassette auf dem Plasmid wurden die Oligonukleotide screen_ErmAM_for und screen_ErmAM_rev (Tab. 7) eingesetzt, welche die für *Bacteroides*-Spezies resistenzvermittelnde Region ErmAM flankieren. Durch anschließende Gelelektrophorese konnte ein Fragment mit der zu erwartenden Größe von 759 bp detektiert werden (Abb. 8 A).

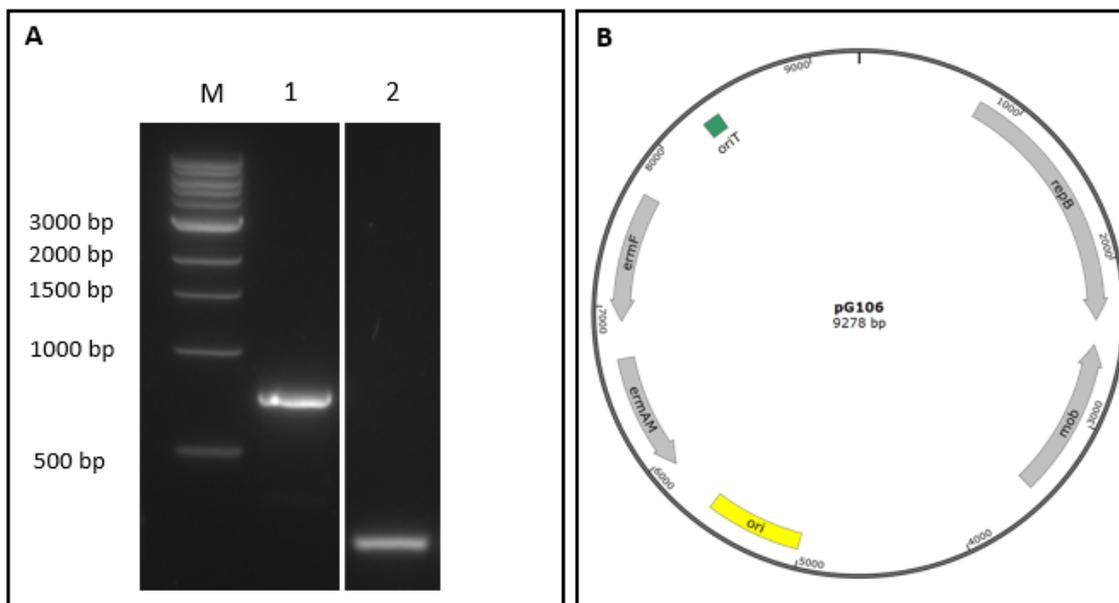


Abbildung 8: Nachweis des shuttle-Vektors pG106 in *P. vulgatus*. (A) Dargestellt sind die PCR-Produkte der flankierenden ErmAM-Region der Erythromycin-Resistenzkassette von pG106 (Spur 1) und der 16S rRNA genspezifische Bereich von *P. vulgatus* (Spur 2). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (B) Plasmidkarte des shuttle-Vektors pG106. Die 5 kb große Mob-rep-Region entspricht dem OriV (*origin of replication*) für *Bacteroidales*-Spezies. Die ErmF-ErmAM-Resistenzkassette dient der Selektion von *E. coli* (ErmAM) und Spezies der Gattung *Bacteroides* (ErmF). OriT = *Origin of transfe*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*.

Für einen zusätzlichen Nachweis erfolgte eine Untersuchung dieser Kolonien mit für *P. vulgatus* 16S rRNA genspezifischen Oligonukleotiden. Durch eine Amplifizierung des Fragments mit einer Bandengröße von 200 bp (Abb. 8 A, Spur 2) konnte bestätigt werden, dass das Plasmid von *P. vulgatus* aufgenommen wurde.

3.2. Charakterisierung der Lactat-Dehydrogenase aus *P. vulgatus*

Durch die Etablierung der beiden Plasmidsysteme pMM656 und pG106 für die Anwendung in *P. vulgatus*, sollte zunächst untersucht werden, ob durch eine Überexpression von Genen, der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* gezielt modifiziert werden kann. Eines der metabolischen Endprodukte, welche von *P. vulgatus* gebildet wird, ist Lactat. Da Lactat nicht weiter von *P. vulgatus* verstoffwechselt wird, sollte die Überproduktion dieser Verbindung keinen negativen Einfluss auf den Organismus haben. Daher stellte sich die Frage, ob durch eine Überexpression verantwortlicher Gene mehr Lactat gebildet und somit das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte verschoben werden könnte. Dafür wurde zunächst das Genom von *P. vulgatus* auf das Vorhandensein einer Lactat-Dehydrogenase (LDH) analysiert.

3.2.1. Bioinformatische Analyse von *bvu_2499*

Basierend auf bioinformatischen BLAST-Analysen, mit bereits charakterisierten D-LDH als Referenz (P52643, Q9I530, P26297, P26298, A0A0E2BVW2), konnte ein *ldh* Gen (*bvu_2499*) identifiziert werden, welches putativ eine D-LDH (EC 1.1.1.28) kodiert. Diese Klasse von Enzymen katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu D-Lactat, gekoppelt mit der Oxidation von NADH zu NAD⁺ (Holbrook *et al.*, 1975).

Für einen zusätzlichen Nachweis, dass es sich bei diesem Enzym um eine D-LDH und nicht um eine L-LDH handelt, wurde ein multipler Sequenzvergleich mit bereits charakterisierten D-LDH durchgeführt, um kennzeichnende Motive auszumachen (Abb. 9).

Diese Analyse zeigte, dass in der Aminosäuresequenz von *P. vulgatus* Bereiche vorhanden sind, welche an der Coenzymbindung (Abb. 9, blau) und Substratbindung (Abb. 9, rot) beteiligt sind. Beide Bereiche sind charakteristisch für D-LDH (Furukawa *et al.*, 2018). Ebenso konnten Scharnierbereiche zwischen

der katalytischen und der NAD-bindenden Domäne nachgewiesen werden (Abb. 9; in Kästen dargestellt), welche ebenfalls für D-LDH bezeichnend sind (Furukawa *et al.*, 2018).

PvLDH	MAYKIAFYDTRKPYDERSFTEANEKFG-FDIRYYKGHLMNMMNVLLTKGVDVVCIFVNDTAD	59
EcLDH	--MKLAVYSTRQYDKRYLQQVNESFG-FELEFFDFLLTERKTAKTANGCEAVCIFVNDGDS	57
PaLDH	--MRILFFSSQAYDSESFQASNHRHG-FELHFQQAHLQADTAVLAQGFVVCAPVNDLDS	57
LcLDH	--MKIIAYGARVDEIQYFKQWAKDTG-NTLEYHTEFLDENTVENARGFQDGINSLQTFYA	57
LpLDH	--MKIIAYAVRDDRPFDFDWMKENPDVEVKLVPELLTEDNVDLARGFDGADVYQKQDYT	58
LdLDH	-MTKIFAYAIREDKPFLEKWEHAHKDVEVEYTDKLLTPETVALARGADGVVYQQLDVT	59
	: : : : : . : . * . . . : * : :	
PvLDH	AEVIRAMADNGVKLLALRCAGYNNVDLAAT-AGKMKVTRVPAYSPYVAEFTVALMLSLN	118
EcLDH	RPVLEELKKHGVKYLALRCAGFNNVDLDAAKELGLKVTVPAYDPEAVAHAIGMMMTLN	117
PaLDH	RPVLERLAAGGTRLVALRSAGYNNVDLAAAEALGLPVTVHPAYSPHAVAHAIGGLILTLN	117
LcLDH	AGVFERMHAYGIKFLTIRNVGTDNIDMTAMKQYGIKLSNVPAYSPAAIAEFALDTLTYLL	117
LpLDH	AEVLNKLADEGVKNSLNRVGVNDLVDPTVKARGLNISNVPAYSPNAIAELSVTQMLQLL	118
LdLDH	AETLQALADNGITKMSLRNVGVNDIDMAKAKELGFQITNVPEVYSPNAIAEHAIAQAARIL	119
	. : . : * : : * . * : : * : : : : : . * . * . * * : * : :	
PvLDH	RKI PRATMRTRDGNFSL-HGLMGFDMHGKTAGIIGTGKIAKILIQILRGFGMNVLAYDLY	177
EcLDH	RRIHRAYQRTRDANFSL-EGLTGFTMYGKTAGVIGTGKIGVAMLRILKFGPMRLLAFDPY	176
PaLDH	RRLHRAYNRTREGDFSL-HGLTGFDLHGKRVGVIGTQGIQETPARIMAGFGCELLAYDYPY	176
LcLDH	RNMKVQAQLQAGDYEKAGTFIIGKELGQQTGVGMGTGHIGQVAIKLFGFGAKVIAYDYPY	177
LpLDH	RQTFMFKKLAKQDFRW-APDIKELNMTMTVGVIGTGRIGRAAIDIFKGFPAKVIYDVPY	177
LdLDH	RODKAMDEKVARHDLRW-APTIGREVRDQVGVIGTGHIGQVFMQIMEGFGAKVIAYDIF	178
	* . : : : . : . * : : * : * . : : * * . : : * : :	
PvLDH	PDYNFAREHQVYVCTLDELHYHSSDIISLHCPLEQTKYLINDYSISKMKDGVMIINTGRG	237
EcLDH	PSAAA-LELGVEYVDLPTLFSSESDVISLHCPLEPENYHLLNEAAFEQMKNGMIVNTRSG	235
PaLDH	PNPRI-QALGGRYLALDALLAESDIVSLHCPLEADTRHLIDAQRLATMKPGAMLINTGRG	235
LcLDH	PMKGD-HP-DFDYVSLDLFKQSDVIDLHVPGIEQNTHIINEAAFNLMPGAIVINTARP	235
LpLDH	RNAEL-EKEGMYVDLDELAYQADVITLHVPALKDNYHMLNADAFSKMKDGAAILNPARG	236
LdLDH	RNPEL-EKKGYYVDSLDDLYKQADVISLHVPDPVAVHMINDESIARKMQDQVIVNVSARG	237
	* * . : * : * * . : : : : : * * . . : * . *	
PvLDH	QLIHTNALIEGLKTRKVGAGLDVYEEBEPYFYEDKSDKIIDDFTLARLLSFNNVIVTSH	297
EcLDH	ALIDSQAIEALKNQIGSLGMDVYENRDLFFEDKSNVDIQDDVFRRLSACHNVLFVGH	295
PaLDH	ALVNAALIEALKSGQLGVLGLDVYEEADIFFEDRSDQPLQDDVLRLLSFPNVVVAH	295
LcLDH	NLIDTQAMLSNLKSGKLAGVGDITYEYETEDLLNLRKHSFKDFLWDELGLMPNVVLSPH	295
LpLDH	TLIDSDELKALDSGKAVAGAALVTYEBTKIFNKDLEGQTIIDKVFMLNFRDNVLTTPH	296
LdLDH	PLVDTDAVIRGLDSGKIFGYAMDVYEGEVGIFNEDWEGKEFPDARLADLIARPNVLTTPH	297
	* : . : : * . . : : . : . * * : : : . : * * * * : : * * : : *	
PvLDH	QAFPTKEAMTNIAHTTLQNVKDFAESRSLVNEVAVGRV	335
EcLDH	QAFPTAEALTSISQTTLQNLNLEKGETCPNELV---	329
PaLDH	QAFPTREALAIAADTTLDNIAAQDGTFRNRVRA---	329
LcLDH	IAYPTETAVHNMVYFSLQHLVDLTKGETSTEVTPAK	333
LpLDH	TAFPTETAVHNMVHVSMNSNRQFIETGKADTQVKFD--	332
LdLDH	TAFPTTHAVRNMVKAFDNNLELVEGKEAETPVKVG--	333
	* : * * * : : : :	

Abbildung 9: Multisequenzvergleich verschiedener D-LDH. Die Aminosäure-Sequenzen der D-LDH von *P. vulgaris* (PvLDH; A6L392), *Pseudomonas aeruginosa* (PaLDH; Q9I530), *E. coli* (EcLDH; P52643), *Lactobacillus (L.) delbrueckii*, (LdLDH; P26297) und *L. pentosus* (LpLDH; P26298), sowie die D-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase von *L. casei* (LcLDH; A0A0E2BVW2) wurden miteinander verglichen. Die charakteristischen Motive für D-LDH sind entsprechend nach Furukawa *et al.* (2018) gekennzeichnet: Die Aminosäuren der Substratbindestelle sind in Rot dargestellt, die an der Coenzymbindung beteiligten Reste in Blau. Die beiden Scharnierbereiche zwischen der katalytischen und der NAD-bindenden Domäne sind in Kästen abgebildet.

3.2.2. Klonierung, Überproduktion und Aufreinigung von BVU_2499

Um die D-LDH aus *P. vulgaris* genauer zu charakterisieren, wurde das Gen *bvu_2499* zunächst in den Überexpressionsvektor pASK5 kloniert. Unter Verwendung der Oligonukleotide pASK5_LDH_for und

pASK5_LDH_rev (Tab. 7) wurde das *ldh* Gen aus der genomischen DNA von *P. vulgaris* vervielfältigt und eine *Bsa*I-Schnittstelle stromaufwärts und stromabwärts der kodierenden Nukleotidsequenz eingebracht. Durch anschließenden Verdau der aufgereinigten Amplifikate, sowie des pASK5 Vektors durch das Restriktionsenzym *Bsa*I, wurde mittels anschließender Ligation das Konstrukt pASK5_LDH generiert. Nach Transformation des generierten Plasmids mittels Hitzeschock in *E. coli* DH5 α , konnte durch eine Kolonie-PCR die korrekte Klonierung verifiziert werden. Durch Verwendung der Oligonukleotide pASK_for und pASK_rev (Tab. 7) wurde ein Fragment erzeugt, welches der zu erwartenden Größe von 1012 bp entsprach (Abb. 10 A).

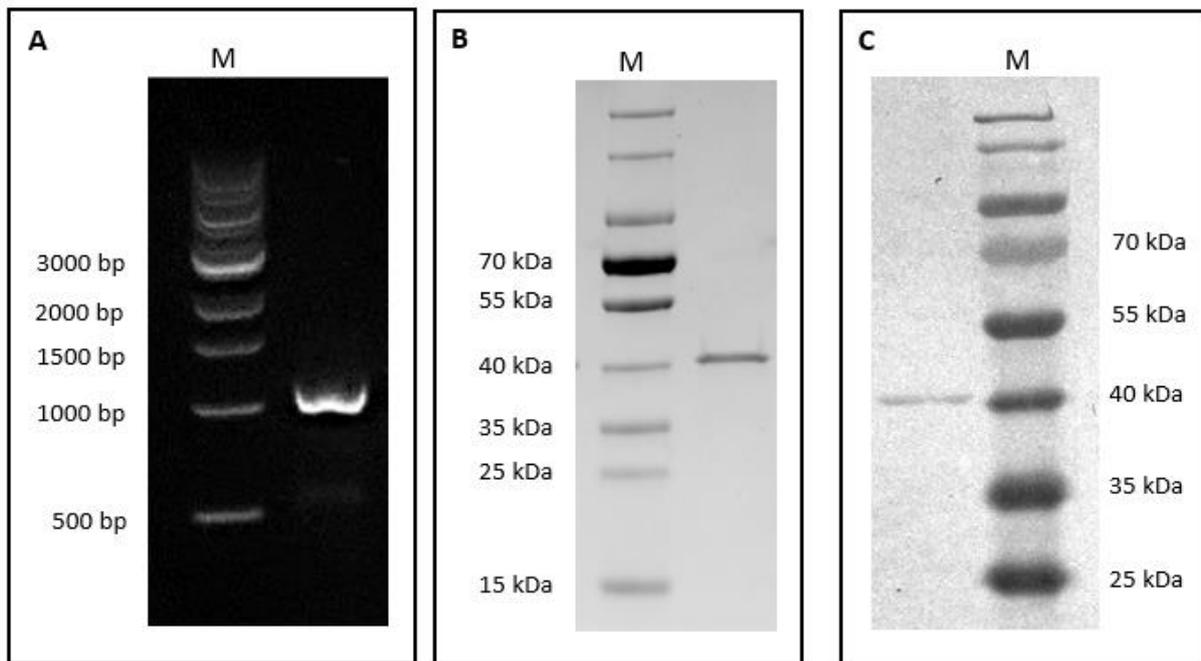


Abbildung 10: Gelelektrophorese und SDS-Page-Analyse von BVU_2499. (A) Kolonie-PCR zum Nachweis des Konstrukts pASK5_LDH in *E. coli* DH5 α . Amplifizierung mit der erwarteten Fragmentgröße von 1012 bp. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (B) Silberfärbung und (C) Westernblot des aufgereinigten Proteins. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Über die pASK5 vermittelte Fusion eines N-terminalen Strep-Tags wurde anschließend eine Aufreinigung des heterolog produzierten Proteins über Affinitätschromatographie durchgeführt. Mittels Proteinquantifizierung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde in den Elutionsfraktionen eine Ausbeute von 27 mg/l Kultur ermittelt. Um die Produktion und Aufreinigung der rekombinanten D-LDH zu bestätigen, sowie die Reinheit der Eluate zu prüfen, wurden die aufgereinigten Proteine durch eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Silberfärbung (Abb. 10 B) und Westernblot (Abb. 10 C) analysiert. In beiden Fällen konnte eine einzelne Bande mit einer Größe von etwa 40 kDa detektiert werden, was der bioinformatisch berechneten Größe für die rekombinante D-LDH mit Strep-Tag von 39,1 kDa entsprach. Da weder auf dem silbergefärbten SDS-Gel noch auf der Western-Blot-Membran

Proteinverunreinigungen festgestellt werden konnten, wurde bestätigt, dass das Protein ohne sichtbare Kontaminationen aufgereinigt wurde. Daher konnte bei der anschließenden funktionalen Charakterisierung der D-LDH die enzymatische Aktivität eindeutig zugewiesen werden.

3.2.3. Bestimmung kinetischer Parameter der D-LDH aus *P. vulgatus*

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Aktivität des Enzyms genauer untersucht. Hierfür wurde die Absorptionsänderung, durch die Oxidation von NADH zu NAD⁺ während der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, bei einer Wellenlänge von 340nm gemessen.

Zur Ermittlung des optimalen Temperatur- und pH-Bereichs wurden enzymatische Tests mit aufgereinigter D-LDH und verschiedenen Temperatur- bzw. pH-Werten durchgeführt. Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde Tris-HCL-Puffer im Enzymassay mit einem konstanten pH-Wert von 8 eingesetzt, während die Reaktionstemperatur zwischen 30 und 80 °C variierte. Bei einer Temperatur von 60 °C konnte hierbei das Optimum für BVU_2499 ermittelt werden (Abb. 11 A). Allerdings wies das Enzym bei dieser Temperatur nur eine Halbwertszeit von weniger als zwei Minuten auf, was darauf hindeutete, dass die D-LDH nicht hitzestabil ist. Die optimale Wachstumstemperatur von *P. vulgatus* beträgt 37 °C, was der physiologischen Temperatur des menschlichen Darms, dem natürlichen Habitat des Organismus, entspricht. Bei dieser Temperatur war das aufgereinigte Protein über mehrere Stunden stabil und zeigte noch 86,6 % seiner maximalen Aktivität bei 60 °C auf (Abb. 11 A).

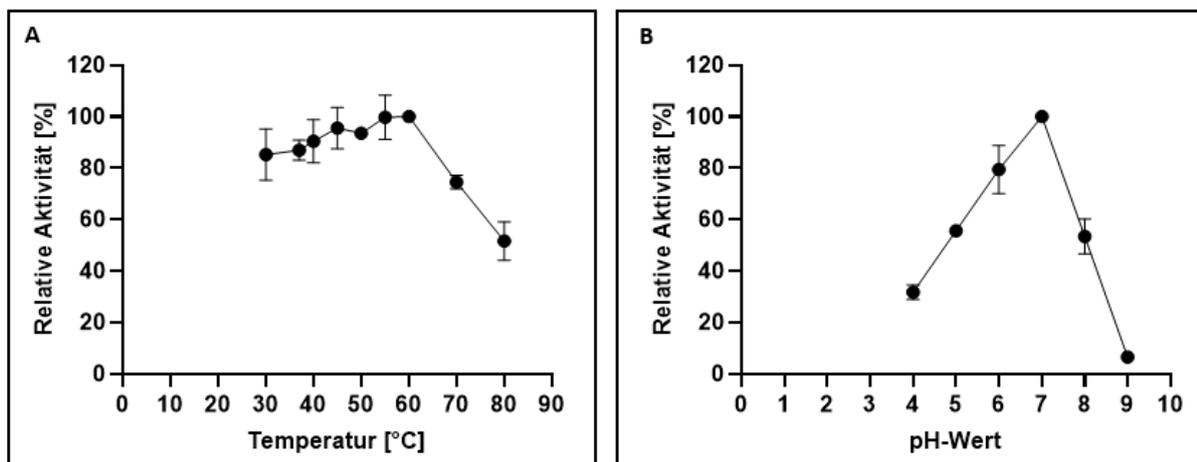


Abbildung 11: Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums von BVU_2499. Die Messungen erfolgten mit 5 µg aufgereinigtem Enzym bei variierenden Temperatur- bzw. pH-Werten. Als Substrat wurde 5 mM Pyruvat eingesetzt. (A) Bestimmung des Temperatur-Optimums. (B) Bestimmung des pH-Optimums. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben.

Die Ermittlung des pH-Optimums und der entsprechenden Enzymaktivitäten erfolgte bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C. Die eingesetzten Puffer (siehe Kapitel 2.1.7.) variierten in einem pH-Bereich von pH 4 bis pH 9. Unter diesen Bedingungen konnte für BVU_2499 ein pH-Optimum von 7 bestimmt werden (Abb. 11 B).

Anschließend wurden die kinetischen Parameter der aufgereinigten D-LDH analysiert. Wichtige Parameter hierfür waren die maximale Umsatzrate des Enzyms (V_{\max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_m), welche Aufschlüsse über die Affinität des Enzyms zum Substrat Pyruvat lieferten. Zur Bestimmung dieser Parameter wurde bei 37 °C und einem pH-Wert von pH 7 ebenfalls die Absorptionsänderung (ΔE_{340}) photometrisch bestimmt, welche durch die Abnahme von NADH bei verschiedenen Substratkonzentrationen resultierte. Durch die Auftragung einer nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten konnte ein K_M -Wert von $1,4 \pm 0,1$ mM und ein V_{\max} -Wert von $95,6 \pm 3$ U/mg Protein ermittelt werden (Abb. 12).

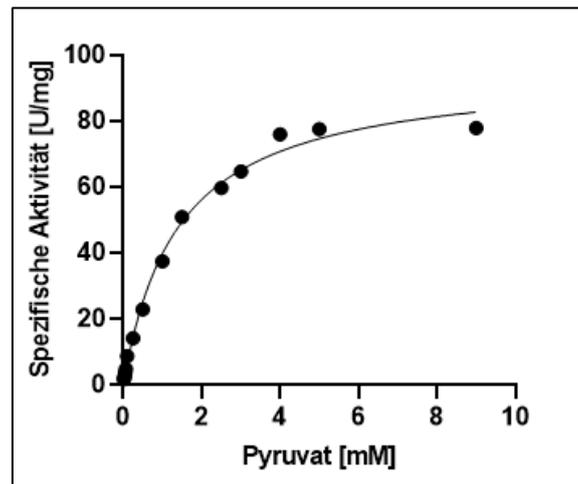


Abbildung 12: Michaelis-Menten-Kinetik zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_M und V_{\max} von BVU_2499. Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von pH 7 durchgeführt. Zur Herstellung des kinetischen Modells wurde die D-LDH mit verschiedenen Pyruvat-Konzentrationen getestet und die Aktivität anhand der Absorptionsänderung bei 340nm bestimmt.

3.3. Homologe Expression von *bvu_2449* in *P. vulgatus*.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Vektor pMM656 in das Genom von *P. vulgatus* integriert und auch der *shuttle*-Vektor pG106 stabil in dem Organismus repliziert wird, sollte das Gen *ldh* (*bvu_2499*) aus *P. vulgatus* für eine homologe Expression in beide Plasmide kloniert werden. Dadurch sollte überprüft werden, ob durch eine Überexpression der *ldh* in *P. vulgatus* schlussendlich mehr Lactat gebildet wird und somit das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte gezielt verschoben werden kann.

3.3.1. Konstruktion von pMM656_IdhnP und pG106_IdhnP, sowie deren Transfer in *P. vulgatus*

Für die Klonierung des *ldh*-Gens in den genomintegrativen Vektor pMM656 wurde eine DNA-Assemblierung nach Angaben des Herstellers NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Durch die Primer *as_IdhnP_pMM656_for* und *as_IdhnP_pMM656_rev* (Tab. 7) wurde das entsprechende Gen (*bvu_2499*) aus genomischer DNA von *P. vulgatus* mit komplementären Enden zum Vektorrückgrat amplifiziert. Da wenig über Promotorstrukturen in *P. vulgatus* bekannt war, flankierte dieses Primerpaar auch 250 bp der stromaufwärts gelegenen Sequenz zur Initiation der Transkription. Durch Verwendung der Oligonukleotide *bb_pMM656_IdhnP_fwd* und *bb_pMM656_IdhnP_rev* (Tab. 7) wurde das Fragment des Vektorrückgrats generiert. Die Primer wurden so gewählt, dass der aus *B. thetaiotaomicron* stammende Promotor pRhaKIPAO und das kodierende Gen der NanoLuc-Luciferase nicht mit amplifiziert werden sollten, sondern nach Assemblierung gegen die Sequenz der *ldh* mit stromaufwärts gelegener Promotorsequenz ausgetauscht wurden. Die Verknüpfung beider Fragmente in der richtigen Orientierung erfolgte durch Einsatz des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes nach Angaben des Herstellers. Das fertige Konstrukt pMM656_IdhnP (Abb. 13 C) wurde in *E. coli* λ pir S17-1 transferiert, vervielfältigt und anschließend über biparentale Konjugation in *P. vulgatus* eingebracht.

Mittels Kolonie-PCR wurden nach 48 h die auf den selektiven Agarplatten (100 μ g/ml Erythromycin und 200 μ g/ml Gentamycin) gewachsenen Kolonien überprüft. Mit den Primern *screen_pMM656_fw* und *screen_pMM656_rev* (Tab. 7) konnte durch die Amplifizierung eines 1468 bp großen Fragments die Integration von pMM656_IdhnP in das Genom von *P. vulgatus* bestätigt werden, da dieses Primerpaar die auf dem Plasmidrückgrat kodierte DNA-Sequenz von *ldh* mit dazugehörigem Promotorbereich flankierte. Ebenso konnte ein für *P. vulgatus* 16S rRNA genspezifisches Fragment nachgewiesen werden (Abb. 13 A).

Als Nächstes wurde untersucht, in welches der beiden tRNA^{Ser} Gene von *P. vulgatus* (*bvu_2451* oder *bvu_2094*) das Plasmid integriert war. Zum Nachweis wurden die Oligonukleotide *attB2451_for/attB2094_for* und *attB_inErm_rev* (Tab. 7) eingesetzt, wobei der *reverse*-Primer in der Erythromycin-Resistenzkassette auf dem Vektorrückgrat und der jeweilige *forward*-Primer stromaufwärts der untereinander hochkonservierten tRNA^{Ser} Gene *bvu_2451* und *bvu_2094* band. Die zu erwartende Bandengröße von 1021 bp wurde nur unter Verwendung des *forward*-Primers *attB2094_for* amplifiziert, wodurch geschlussfolgert werden konnte, dass pMM656_IdhnP am 3' Ende des Gens *bvu_2094* im Genom von *P. vulgatus* integriert wurde (Abb. 13 B, Spur 2).

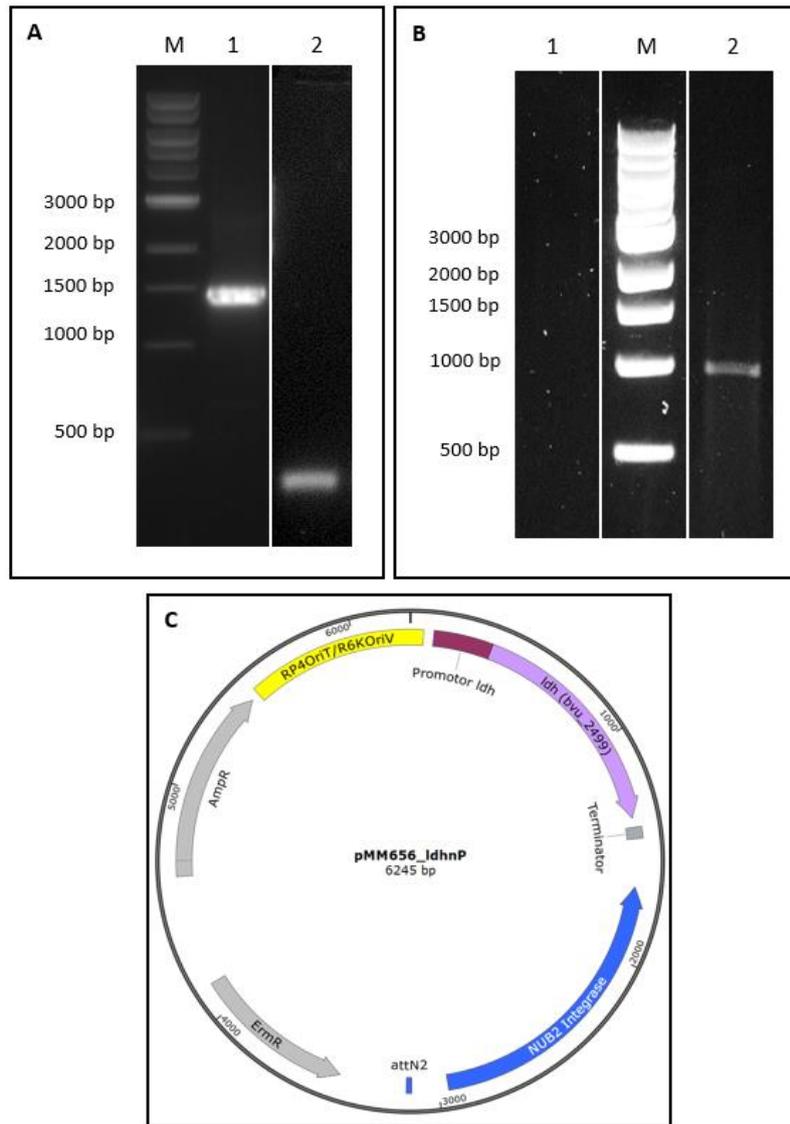


Abbildung 13: Kolonie-PCR und Plasmidkarte des erstellten Plasmids pMM656_IdhnP. (A) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme von pMM656_IdhnP durch *P. vulgatus*. Spur 1 = Plasmidbereich, welcher *Idh* mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz flankiert; Spur 2 = 16S rRNA genspezifischer Bereich von *P. vulgatus*. (B) Agarosegel zum Nachweis der Integration von pMM656_IdhnP in das tRNA^{Ser} kodierende Gen *bvu_2094* (Spur 2) aus *P. vulgatus*. Die Oligonukleotide attB2451_for/attB2094_for und attB_inErm_rev wurden für den Nachweis der Integration eingesetzt, wobei der entsprechende *forward*-Primer im Genom und der *reverse*-Primer auf dem Plasmidrückgrat bindet. Spur 1 = tRNA^{Ser} kodierendes Gen *bvu_2451*. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (C) Plasmidkarte von pMM656_IdhnP. AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette; ErmR = Erythromycin-Resistenzkassette; R6KOriV = *origin of replication*; RP4OriT = *origin of transfer*.

Für die Klonierung von *Idh* in den pG106 *shuttle*-Vektor wurde die kodierende Sequenz der D-LDH aus *P. vulgatus* mit 250 bp stromaufwärts gelegener nativer Promotorsequenz mittels der Oligonukleotide *Idh_nativP_Sall_for* and *Idh_SphI_rev* (Tab. 7) amplifiziert. Durch die Wahl der Primer wurden Schnittstellen für *Sall* und *SphI* eingefügt. Nach Restriktionsverdau von Vektor (pG106) und Amplifikat mit *Sall* und *SphI* und anschließender Ligation entstand das Konstrukt pG106_IdhnP (Abb. 14 B), welches in *E. coli* DH5 α durch einen Hitzeschock eingebracht wurde. Mittels Elektroporation konnte

das Plasmid in *P. vulgatus* transferiert werden, wodurch der Stamm *P. vulgatus* pG106_IdhnP entstand. Durch eine Kolonie-PCR wurde das Vorhandensein des Gens *ldh* mit 250 bp nativer Promotorsequenz stromaufwärts des Gens überprüft und verifiziert. Unter Verwendung der Oligonukleotide screen_pG106_for und screen_pG106_rev (Tab. 7), welche im Plasmidrückgrat banden und die entsprechende Gensequenz flankierten, wurde die prognostizierte Fragmentgröße von 1560 bp nachgewiesen (Abb. 14 A, Spur 1). Zur Verifizierung von *P. vulgatus* wurde ein 200 bp großes Fragment amplifiziert, welches dem 16S rRNA genspezifischen Bereich des Organismus entsprach (Abb. 14 A, Spur 2).

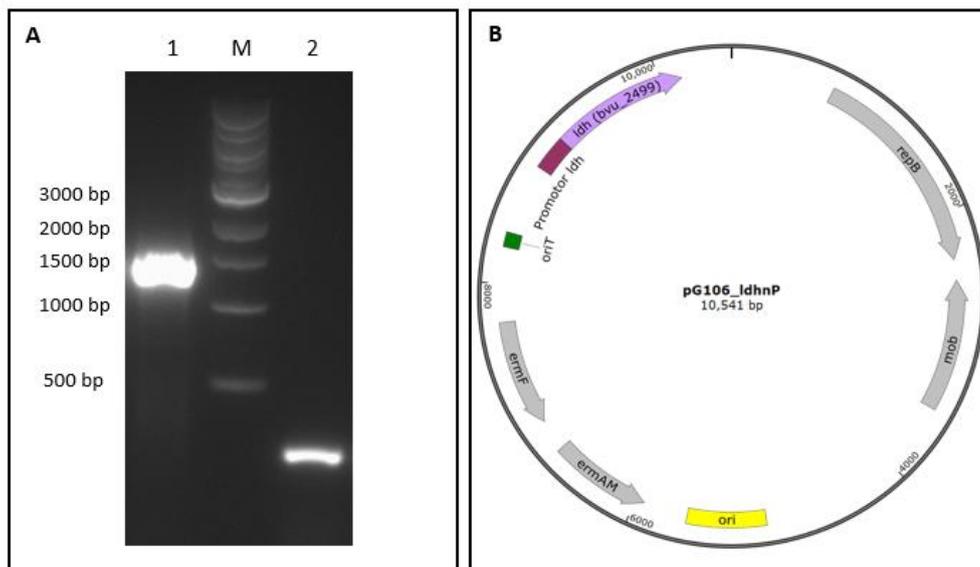


Abbildung 14: Kolonie-PCR und Plasmidkarte des erstellten Konstrukts pG106_IdhnP. (A) Gelelektrophorese zum Nachweis der Transfers von pG106_IdhnP in *P. vulgatus*. Spur 1 = Plasmidbereich, welcher *ldh* mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz flankiert; Spur 2 = 16S rRNA genspezifischer Bereich von *P. vulgatus*. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (B) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pG106_IdhnP. Das Plasmid kodiert *bvu_2499* inklusive 250 bp der stromaufwärts-Sequenz zur Initiation der Transkription. Die 5 kb große Mob-rep-Region entspricht dem OriV (*origin of replication*) für *Bacteroidales*-Spezies. Eine ErmF-ErmAM-Resistenzkassette zur Selektion von *E. coli* (ErmAM) und *Bacteroidales*-Spezies (ErmF). OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*.

3.3.2. Wachstumsvergleich zwischen Wildtyp und *ldh*-Expressionsmutanten von *P. vulgatus*

Um zu überprüfen, ob der jeweilige Expressions-Vektor einen negativen Einfluss auf das Wachstum der beiden *P. vulgatus* Mutanten hatte, wurde deren Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Hierfür erfolgte eine Kultivierung aller Stämme in einem Plattenlesegerät. *P. vulgatus* Wildtyp, als auch *P. vulgatus* pMM656_IdhnP und pG106_IdhnP, erzielten auf Minimalmedium mit Glucose als Substrat eine maximale OD₆₀₀ von 1 (Abb. 15). Dabei erreichte der Wildtyp eine Verdopplungszeit von $0,83 \pm 0,05$ h. Die Verdopplungszeiten der Mutanten von $0,91 \pm 0,1$ h bei

P. vulgatus pG106_IdhnP und $0,86 \pm 0,075$ h bei *P. vulgatus* pMM656_IdhnP waren mit der des Wildtyps vergleichbar (Abb. 15), sodass eine Wachstumslimitierung aufgrund der Integration (pMM656) oder Replikation (pG106) der Expressionsvektoren ausgeschlossen werden konnte.

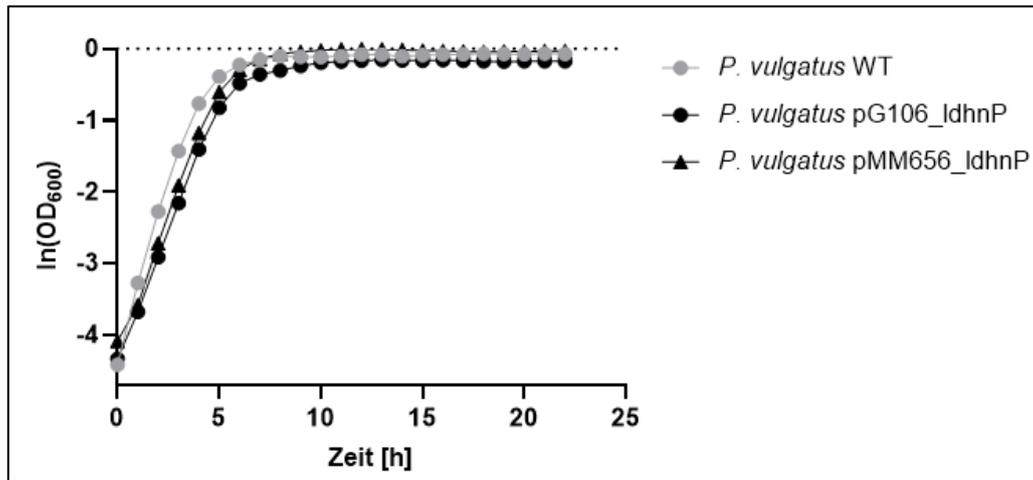


Abbildung 15: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und Mutanten *P. vulgatus* pG106_IdhnP sowie *P. vulgatus* pMM656_IdhnP in DMMG-Medium. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C für 24 h. DMMG-Medium wurde 1 %ig [v/v] aus einer Vorkultur beimpft.

3.3.3. Kopienzahl und Transkriptabundanz des *ldh*-Gens in *P. vulgatus* Wildtyp und genetisch modifizierten Mutanten zur Expression von *bvu_2499*.

Um die Bedingungen für eine homologe Überproduktion der D-LDH aus *P. vulgatus* genauer zu analysieren, wurde die Kopienzahl des *ldh* Gens in *P. vulgatus* pMM656_IdhnP und *P. vulgatus* pG106_IdhnP im Vergleich zum Wildtyp mittels qPCR untersucht. Als Referenzgen wurde das für das ribosomale Protein L23 kodierende Gen *bvu_0803* aus *P. vulgatus* verwendet. Als Bestandteil der Ribosomen wird das entsprechende Protein während der exponentiellen Wachstumsphase konstant produziert. Zur Bestimmung der relativen Anzahl der *ldh*-Gene wurden die genspezifischen Primer qPCR_Idh_for und qPCR_Idh_rev (Tab. 7) verwendet.

Die höchste Kopienzahl des *ldh* Gens konnte bei *P. vulgatus* pG106_IdhnP nachgewiesen werden (Abb. 16 A), bei welchem das Gen auf dem *shuttle*-Vektor kodiert vorlag. Hierbei war die Anzahl der PCR-Amplifikate des *ldh*-Gens 32 ± 6 -mal höher im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, der nur eine Kopie des *ldh* Gens besaß. Die Anzahl der PCR-Amplifikate des *ldh* Gens bei *P. vulgatus* pMM656_IdhnP hingegen war, verglichen mit *P. vulgatus* Wildtyp, $2,2 \pm 0,4$ - mal höher (Abb. 16 A). Im *P. vulgatus* Wildtyp wird das *ldh* Gen durch eine chromosomale Kopie kodiert. Daher war es offensichtlich, dass bei *P. vulgatus* pMM656_IdhnP eine zusätzliche Kopie durch die Integration des Vektors pMM656_IdhnP in das Genom des Organismus über das 3'-Ende des Gens *bvu_2094* vorhanden war. Ebenso konnte

festgehalten werden, dass 32 ± 6 Kopien des *ldh* Gens in der *shuttle*-Vektor basierten Mutante *P. vulgatus* pG106_IdsnP kodiert vorlagen. Dies deutete darauf hin, dass in *P. vulgatus* die Kopienzahl des *shuttle*-Vektors pG106_IdsnP in einer Größenordnung von 30 lag.

Neben der Quantifizierung der *ldh*-Kopienzahl wurde die Transkriptabundanz von chromosomaler und Plasmid-kodierter *ldh* der mutierten Stämme mit der Transkriptmenge des chromosomal kodierten *ldh* Gens im Wildtyp-Stamm verglichen. Für diese Analyse wurde die Gesamt-RNA von in BHI-Medium exponentiell gewachsenen Zellen der jeweiligen Stämme extrahiert. Die mRNA-Konzentration wurde mittels RT-qPCR unter Verwendung der für das *ldh* genspezifischen Primer bestimmt. Als Referenz wurde die Transkriptmenge des Gens *bvu_0803* (*ribL23*), welches für das ribosomale Protein L23 kodiert, verwendet. Die Methodik der RT-qPCR und die entsprechende Auswertung sind in Kapitel 2.4.1.4. beschrieben.

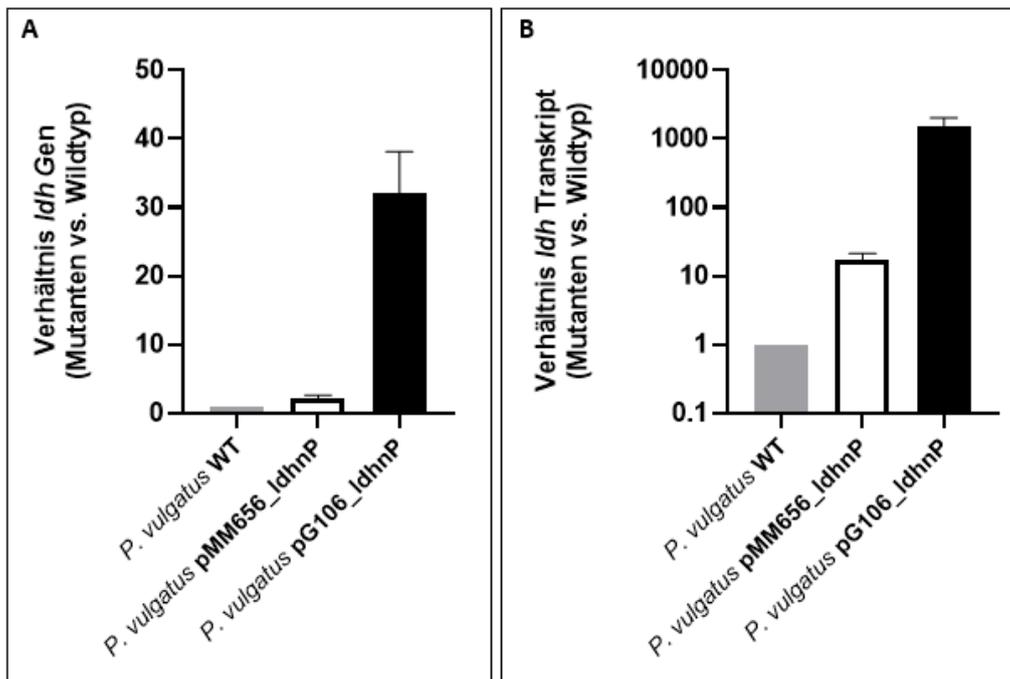


Abbildung 16: *ldh* Kopienzahl und Transkriptabundanz in *P. vulgatus* Wildtyp und *ldh*-Expressionsmutanten von *P. vulgatus*. (A) Zur Bestimmung der Kopienzahl, wurde eine qPCR durchgeführt, um die chromosomal und Plasmid-kodierte *ldh* der mutierten Stämme mit der chromosomal kodierten *ldh* des Wildtyp-Stammes zu vergleichen. (B) Die relative Transkriptmenge wurde mittels RT-qPCR analysiert. Δ CT-Werte stellen die Differenz des Ct-Werts des *ldh* Gens (*bvu_2499*) mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L23 (*bvu_0803*) dar. Für die Bestimmung der Verhältnisse an mRNA zum Wildtyp wurden die $\Delta\Delta$ CT-Werte berechnet und die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet. Die in A und B gezeigten Experimente wurden in zweifacher Ausführung mit DNA- oder RNA-Präparaten aus drei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Korrelierend mit der hohen Kopienzahl des *ldh* Gens, wurde bei *P. vulgatus* pG106_IdsnP eine 1521 ± 506 -fach höhere Transkriptmenge an *ldh* mRNA im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. In *P. vulgatus*, welcher den genomintegrativen Vektor pMM656_IdsnP beinhaltete, war das Transkript-Level des *ldh*

Gens 17 ± 4 -fach höher als im Wildtyp (Abb. 16 B). Die erhobenen Daten zeigen, dass das *ldh* Gen in der *shuttle*-Vektor basierten Mutante in deutlich höheren Mengen exprimiert wurde. Dies deutete erstmals darauf hin, dass sich das pG106 *shuttle*-Vektor basierte System für eine gezielte Überproduktion von Proteinen, hier von D-LDH als Fallbeispiel, eignen könnte.

3.3.4. Enzymaktivität von D-LDH in zellfreiem Extrakt von *P. vulgatus*

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen *ldh*-Transkriptmengen sich auf die entsprechende Enzymproduktion auswirkten, wurde die Enzymaktivität der D-LDH in zellfreien Extrakt der jeweiligen *P. vulgatus*-Stämme untersucht. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 340nm, entsprechend der Oxidation von NADH zu NAD⁺ während der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, gemessen.

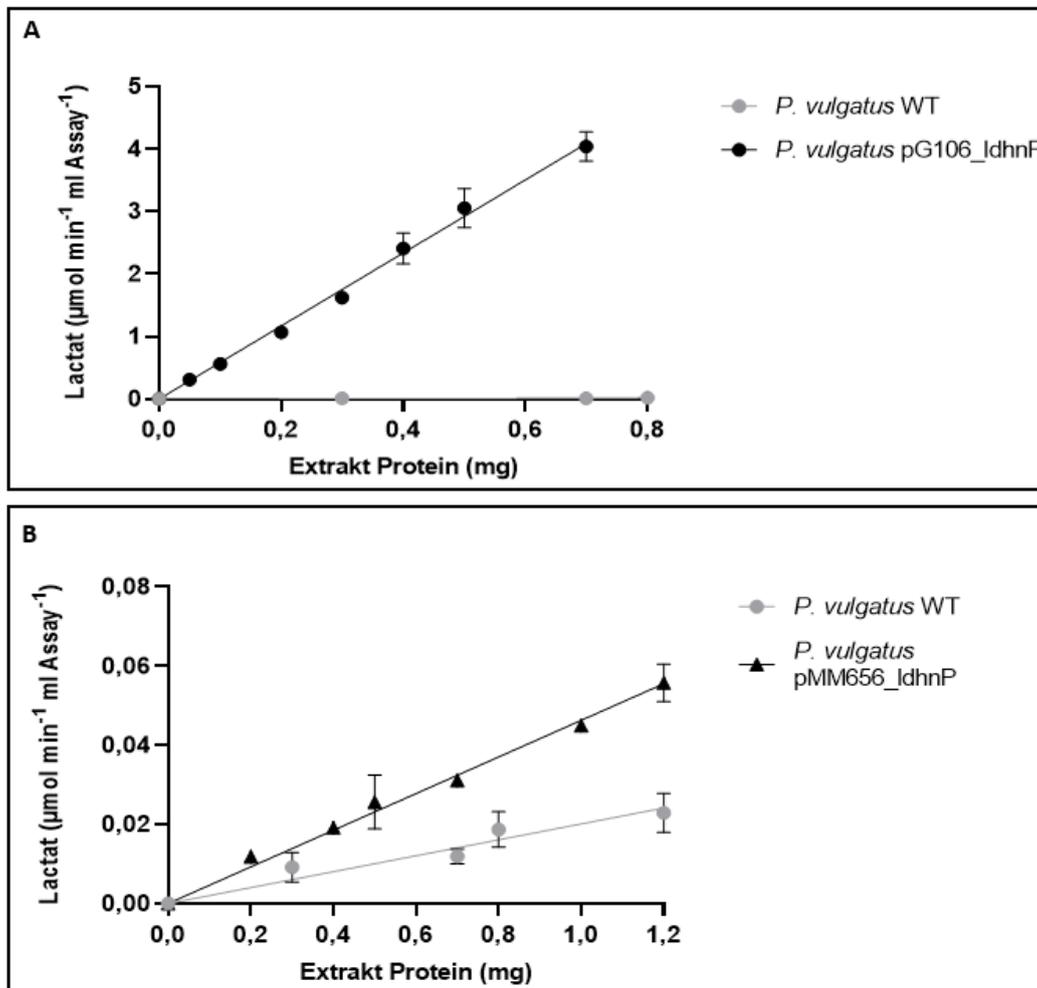


Abbildung 17: Photometrische Analyse der Enzymaktivität der D-LDH in zellfreien Extrakten. (A) Bestimmung der Aktivität der D-LDH aus *P. vulgatus* pG106_IdhnP und (B) *P. vulgatus* pMM656_IdhnP im Vergleich zum Wildtyp. Die Enzymaktivität wurde in zellfreiem Extrakt durch die Absorptionsänderung bei 340nm, entsprechend der Oxidation von NADH zu NAD⁺ während der Umwandlung von Pyruvat zu D-Lactat, bestimmt.

Die in A und B gezeigten Experimente wurden in zweifacher Ausführung mit zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Die höchste Aktivität der D-LDH mit $5,9 \pm 0,4$ U/mg Protein konnte im zellfreien Extrakt von *P. vulgatus* pG106_ldhnP nachgewiesen werden (Abb. 17). Im Vergleich zum Wildtyp, der eine Enzymaktivität von $0,025 \pm 0,002$ U/mg Protein aufwies, entsprach dies einer Erhöhung um den Faktor 236 (Abb. 17 A). Die Enzymaktivität der D-LDH im zellfreien Extrakt der genomintegrativen Mutante *P. vulgatus* pMM656_ldhnP hingegen zeigte mit $0,046 \pm 0,002$ U/mg Protein lediglich eine 1,8-mal so hohe Aktivität verglichen mit der des Wildtyps (Abb. 17 B).

3.4. Einfluss der Enzymaktivität der D-LDH auf das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte von *P. vulgatus*

Nachdem bei beiden genetisch veränderten Mutanten von *P. vulgatus* eine erhöhte Kopienzahl und Transkriptmenge des *ldh* Gens nachgewiesen werden konnte wurde als nächstes untersucht, ob dies einen Einfluss auf den zentralen Kohlenstoffmetabolismus beider mutierten Stämme im Vergleich zum Wildtyp-Stamm hatte. Dafür wurden mehrere Kulturen der entsprechenden *P. vulgatus*-Stämme auf Minimalmedium mit Glucose als Substrat (20 mM) angezogen und das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte mittels HPLC analysiert.

Als metabolische Endprodukte der Glucose-Verwertung konnten Succinat, Acetat, Lactat, Formiat und Propionat detektiert werden (Abb. 18 A). Der größte Unterschied zeigte sich in Bezug auf die Lactatbildung. Der Wildtyp-Stamm von *P. vulgatus* produzierte $0,73 \pm 0,36$ mmol Lactat/g TG. *P. vulgatus* pMM656_ldhnP produzierte mit $0,85 \pm 0,2$ mmol/g TG nur geringfügig mehr Lactat als der Wildtyp. Die höchste Lactat-Menge wurde mit 8,3 mmol/g TG in der *shuttle*-Vektor tragenden Mutante detektiert. Im Vergleich zum Wildtyp entsprach dies einem Verhältnis von 1:11,4 und im Vergleich zu *P. vulgatus* pMM656_ldhnP wurde 9,8-mal so viel Lactat produziert (Abb. 18 C).

Auch der Substratverbrauch der einzelnen Stämme wies Unterschiede auf (Abb. 18 B). Während der *P. vulgatus* Wildtyp und die pMM656_ldhnP tragende Mutante mit $22,5 \pm 2,4$ bzw. $22,9 \pm 3,13$ mmol Glucose/g TG vergleichbare Mengen an Glucose verbrauchten, verstoffwechselte *P. vulgatus* pG106_ldhnP signifikant ($p \leq 0,05$) mehr Glucose ($24,4 \pm 3,15$ mmol Glucose/g TG) in Relation zum Wildtyp (Abb. 18 B).

Bei genauerer Betrachtung der übrigen Endprodukte Succinat, Acetat, Formiat und Propionat zeigte sich, dass bei *P. vulgatus* pG106_ldhnP im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen geringere Mengen an Acetat und Succinat nachgewiesen werden konnten (Abb. 18 A). Mit 9,6 mmol Succinat/g

TG produzierte der Wildtyp die höchste Menge an Succinat, gefolgt von 8 mmol Succinat/g TG durch *P. vulgatus* pMM656_IdhnP. Die Konzentration an Succinat, welche von der *shuttle*-Vektor basierten Mutante produziert wurde, lag bei 7,3 mmol/g TG. Die Menge an gebildetem Acetat war zwischen dem Wildtyp-Stamm und *P. vulgatus* pMM656_IdhnP vergleichbar (12 mmol/g TG bzw. 12,5 mmol/g TG), wohingegen nur 10,8 mmol Acetat/g TG bei *P. vulgatus* pG106_IdhnP nachgewiesen wurde (Abb. 18 A). Die Konzentrationen von Propionat und Formiat lagen innerhalb aller Stämme im Bereich von 1-2 mmol Propionat/g TG bzw. 3-4 mmol Formiat/g TG.

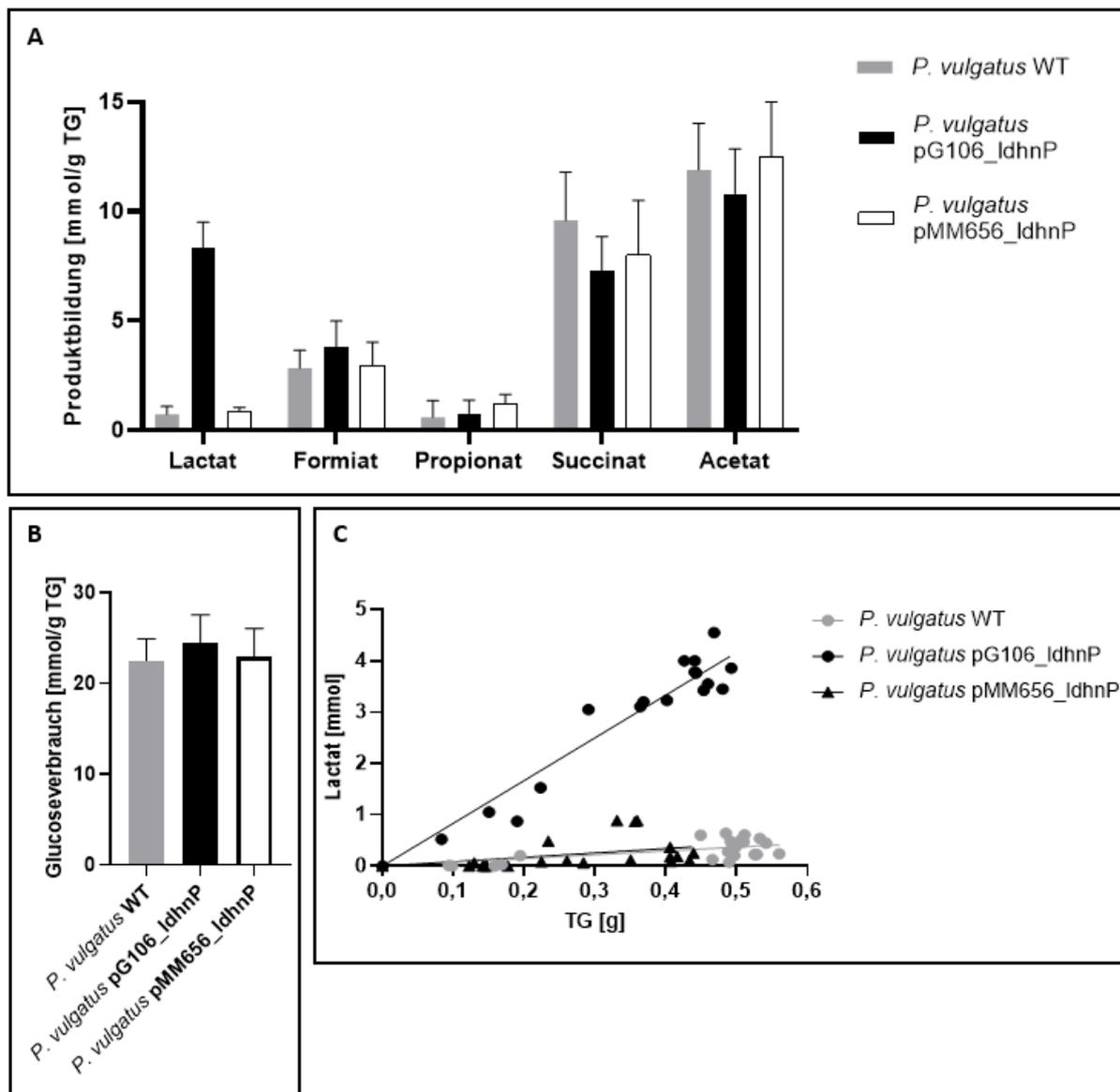


Abbildung 18: Produktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* Wildtyp, *P. vulgatus* pG106_IdhnP und *P. vulgatus* pMM656_IdhnP, während des Wachstums auf DMMG-Medium. 16 Kulturen von jedem Stamm wurden in der exponentiellen Phase geerntet und deren Überstand mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte und des Substratverbrauchs wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. (A) Stoffwechselprodukte und (B) Substratverbrauch bei Wachstum auf DMMG-Medium.

Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. (C) Lactatkonzentration der einzelnen Kulturen bei Wachstum auf DMMG-Medium.

Zusammenfassend führte die *shuttle*-Plasmid basierte Überexpression des *ldh* Gens zu einer gesteigerten Menge an Transkript und erhöhte die Enzymausbeute und die damit einhergehende Aktivität der D-LDH in *P. vulgatus* pG106_IdhnP. Schlussendlich führte dies zu einer Verschiebung des Produktspektrums hin zu einer vermehrten Bildung von Lactat. Eine homologe Überexpression von Proteinen und somit eine gezielte Manipulation des Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* schien somit vor allem durch den *shuttle*-Vektor pG106 möglich zu sein und sollte in folgenden Experimenten zur Steigerung der Succinat-Produktion eingesetzt werden.

3.5. Transkriptmenge und Aktivitätsbestimmung der Enzyme des LUT-Systems in *P. vulgatus*

Durch weitere bioinformatische Analysen zeigte sich, dass im Genom von *P. vulgatus* neben der löslichen D-LDH (BVU_2499) ein Operon vorhanden ist, welches für einen membrangebundenen Lactat-Dehydrogenase Komplex kodiert. Allgemein wird dieses Operon auch als LutABC bezeichnet und umfasst in *P. vulgatus* die Gene *llde* (*bvu_2876*), *lldf* (*bvu_2877*) und *lldg* (*bvu_2878*). Daher wird im Nachfolgenden in der vorliegenden Arbeit dieses Operon in *P. vulgatus* als *lutEFG* bezeichnet.

Um zu überprüfen, ob die entsprechenden Gene überhaupt in *P. vulgatus* exprimiert werden, wurde das Transkript-Level von *llde*, *lldf* und *lldg* mittels RT-qPCR in *P. vulgatus* Wildtyp, sowie in den *ldh* Überexpressionsmutanten analysiert. Hierfür wurde die entsprechende Gesamt-RNA von in DMMG-Medium gewachsenen *P. vulgatus* Zellen extrahiert und die mRNA-Konzentration der jeweiligen Gene unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 7) über RT-qPCR bestimmt. Als Referenzgen wurde das Gen *bvu_2499* (*ldh*) verwendet. Die Methodik der RT-qPCR und die entsprechende Auswertung sind in Kapitel 2.4.14. beschrieben.

Alle drei Gene des LutEFG Operons wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in *P. vulgatus* exprimiert (Abb. 19). Sowohl beim Wildtyp-Stamm als auch bei *P. vulgatus* pG106_IdhnP und *P. vulgatus* pMM656_IdhnP zeigte sich, dass im Verhältnis zum Referenzgen *ldh*, das Gen *llde* die höchste Transkriptmenge und *lldg* das geringste Transkript-Level aufwies (Abb. 19). Hinsichtlich des Wildtyps erzielten *llde* 88 %, *lldf* 89 % und *lldg* 39 % der Transkriptmenge des Referenzgens *ldh* (Abb. 19). Bei *P. vulgatus* pMM656_IdhnP lag das Transkript-Level im Vergleich zum Referenzgen *ldh* bei 41,5 % (*llde*), 39 % (*lldf*) und 18 % (*lldg*). Unter Berücksichtigung der zweifachen Kopienzahl des *ldh* Gens in diesem Stamm (siehe Kapitel 3.3.3.), war dieses Verhältnis der Transkriptmengen mit derer des Wildtyps vergleichbar. Bei der Überexpressionsmutante des *ldh* Gens basierend auf dem *shuttle*-

Vektor pG106 wurde im Verhältnis zum Referenzgen *ldh* deutlich weniger Transkript von *llde* (1 %), *lldf* (0,8 %) und *lldg* (0,4 %) nachgewiesen (Abb. 19).

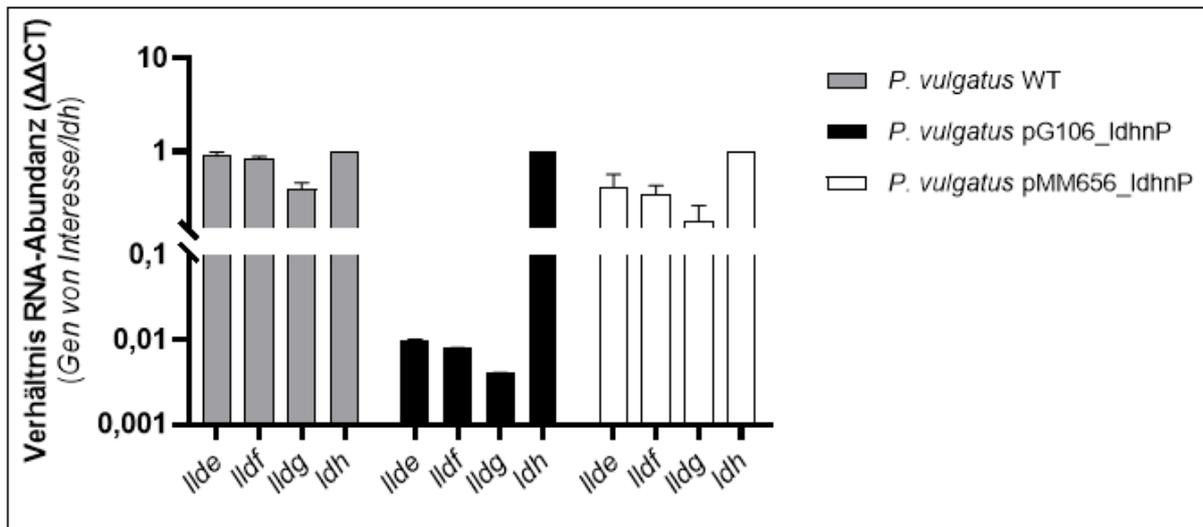


Abbildung 19: Transkriptanalyse der Gene des LutEFG Komplexes von *P. vulgatus* und beiden *P. vulgatus*-Stämmen zur Überexpression des *ldh* Gens. Die relative Transkriptmenge wurde mittels RT-qPCR analysiert. $\Delta\Delta CT$ -Werte stellen die Verhältnisse der Transkriptabundanz der Gene von Interesse im Verhältnis zum *ldh* Gen dar. Für die Darstellung der mRNA-Abundanz-Unterschiede wurde die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet. Das dargestellte Experiment wurde in zweifacher Ausführung mit RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Zur Überprüfung der Aktivität des LutEFG Komplexes sollte die Enzymaktivität unter anaeroben Bedingungen an Membranen von *P. vulgatus* gemessen werden. Zunächst wurde getestet, ob die Membranen von *P. vulgatus* eine generelle Aktivität aufzeigten und somit für folgende Experimente eingesetzt werden konnten. Zur Bestimmung der kombinierten Aktivität der Membrankomplexe Nqr und der membrangebundenen Fumarat-Reduktase (siehe Kapitel 1.2.1.) wurde die Übertragung der Elektronen von NADH auf Fumarat gemessen. Dabei katalysierte der Komplex Nqr die Übertragung der Elektronen von NADH auf Menachinon und im Folgenden katalysierte die Fumarat-Reduktase den Elektronentransfer von Menachinon auf Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor. Die Oxidation von NADH wurde bei einer Wellenlänge von 340nm beobachtet. Durch den Nachweis einer Aktivität von 1,6 U/mg des NADH:Fumarat-Oxidoreduktase-Systems, konnte die Funktionalität der Atmungskette bestätigt werden (Abb. 20 A). Ebenso konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass die Membranpräparation zu einer Inaktivierung von sauerstoffempfindlichen Enzymaktivitäten, beispielsweise der Fumarat-Reduktase, führte.

Um eine mögliche Aktivität von LutEFG an der Membran nachzuweisen, wurden verschiedene Substrate und Elektronendonatoren eingesetzt. Mit Pyruvat als Substrat konnte keine Oxidation von NADH bei einer Wellenlänge von 340nm detektiert werden (Abb. 20 C). Ebenso wurde keine

Absorptionsänderung (ΔE_{340}) mit Lactat als Substrat und NAD^+ als Elektronendonator festgestellt (Abb. 20 D). Zum Nachweis, ob LutEFG möglicherweise Teil des Elektronentransportsystems ist und Lactat als Elektronendonator für Fumarat an der Membran dient, wurde Lactat als möglicher Elektronendonator und Fumarat als Substrat eingesetzt. Hierbei konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 205nm keine Aktivität bzw. Reduktion von Fumarat nachgewiesen werden (Abb. 20 B).

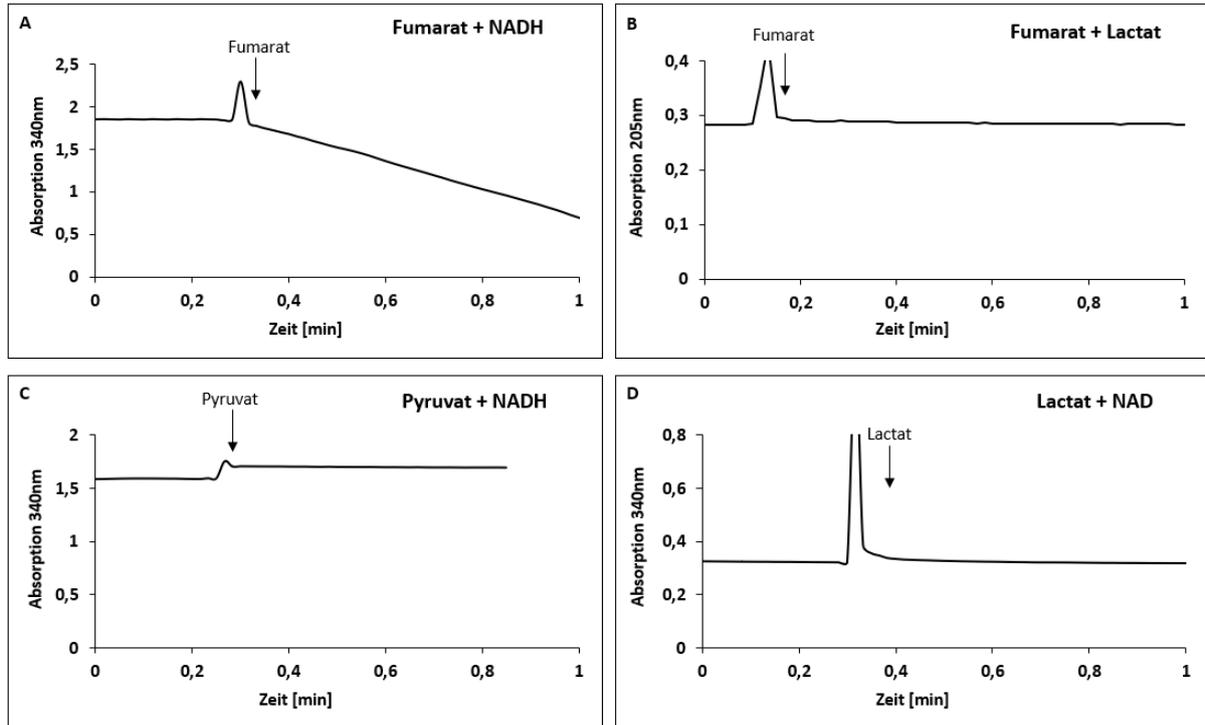


Abbildung 20: Aktivitätsanalyse des LutEFG Komplexes an der Membran von *P. vulgatus*. Die Aktivität wurde unter Einsatz verschiedener Elektronendonatoren und Substrate überprüft. 1 ml Assay beinhaltet: 40 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7), 100 μg *P. vulgatus* Membranprotein und (A) 5 mM Fumarat, 250 μM NADH, (B) 5 mM Fumarat, 5 mM Lactat, (C) 5 mM Pyruvat, 250 μM NADH, (D) 5 mM Lactat, 250 μM NAD. Die Pfeile zeigen die Zugabe des entsprechenden Substrats an. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Reaktionsverlauf dargestellt ist.

Abschließend wurde Methylviologen (MV) als alternativer Elektronendonator mit Pyruvat als Substrat getestet. Dafür wurden 2,5 mM MV_{ox} mit Titan(III)-Citrat reduziert, bis eine Absorption (A_{604}) von etwa 1,5 erreicht war. Auch hierbei konnte keine Reaktion des LutEFG Komplexes an der Membran photometrisch durch eine Absorptionsänderung (ΔE_{604}) nachgewiesen werden (Abb. 21).

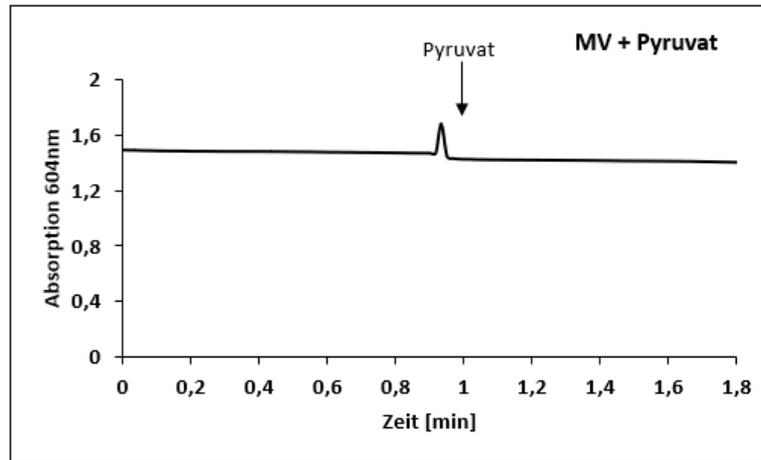


Abbildung 21: Nachweis der Aktivität des LutEFG Komplexes an der Membran von *P. vulgatus* mit MV als alternativen Elektronendonator und Pyruvat als Substrat. 1 ml Assay beinhaltet: 40 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7), 100 μg *P. vulgatus* Membran, 2,5 mM MV_{ox} und 5 mM Pyruvat. Die Reduktion von MV erfolgte durch Titration mit Titan(III)-Citrat.

3.6. Genetische Manipulation des Stoffwechsels von *P. vulgatus* zur Steigerung der Succinat-Produktion durch homologe Genexpression

Als biotechnologisch relevante Verbindung findet Succinat Anwendung bei der Herstellung von biobasierten Polymeren, Lösungsmitteln, Lebensmittelzusatzstoffen oder pharmazeutischen Zwischenprodukten (Nghiem *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Alias und Marsilla, 2020). Grundsätzlich wird Succinat durch den reduktiven und oxidativen Teil des Citratzyklus, sowie den Glyoxylatweg vieler (fakultativ) anaerober Mikroorganismen gebildet (Zeikus *et al.*, 1999). Das wachsende Verständnis für den Klimawandel und die stetig steigenden Ölpreise führten in den letzten Jahren dazu, statt der konventionell petrochemischen Synthese von Succinat, auf nachhaltige, fermentative Herstellungsprozesse zu setzen (Dessie *et al.*, 2018; Nasser *et al.*, 2021). Da *P. vulgatus* durch die Verstoffwechslung pflanzlicher Polysaccharide auf natürliche Weise Succinat bildet, stellt dieser Organismus einen geeigneten Kandidaten für eine biotechnologische Produktion von Bio-Succinat dar. Eine Grundvoraussetzung für die fermentative Produktion von Plattformchemikalien im industriellen Maßstab ist die genetische Manipulation des Stoffwechsels der entsprechenden Organismen. Dies beinhaltet die Überexpression von Genen, wodurch der Kohlenstofffluss gezielt in die Richtung der Synthese des gewünschten Produkts gelenkt werden kann und die Deletion von Genen mit dem Ziel kompetitive Stoffwechselwege auszuschalten. Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das Einbringen und die Überexpression homologer Gene durch einen *shuttle*-Vektor in *P. vulgatus* möglich ist. Im Hinblick auf eine Verschiebung der Endproduktverhältnisse zu Gunsten der Succinat-Produktion wurde im Folgenden dieser Arbeit untersucht, welche Gene in diesem Zusammenhang für

eine homologe Überexpression in *P. vulgaris* geeignet sind. Des Weiteren sollte durch gezielte Gendelektionen im zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgaris* die Bildung von Nebenprodukten reduziert werden und dadurch die Ausbeute von Succinat gesteigert werden.

3.6.1. Homologe Expression der Gene *bvu_1959-61* aus dem Citratzyklus von *P. vulgaris*

P. vulgaris bildet Succinat grundsätzlich über einen nicht-geschlossenen Citratzyklus, welcher sich in einen oxidativen und einen reduktiven Abschnitt unterteilt. Beide Wege enden mit der Bildung von Succinat. Eine detaillierte Beschreibung des reduktiven und oxidativen Abschnitts des Citratzyklus in *P. vulgaris* wird in Kapitel 4.4.1. erläutert. Bei Organismen mit anaerober Fumarat-Atmung, wie in *P. vulgaris*, basiert die zelluläre relevante Succinat-Produktion jedoch auf dem reduktiven Teil. Da im Zuge dessen Reduktionsäquivalente ([H]) benötigt werden, schien eine Überexpression von Genen des oxidativen Citratzyklus für eine vermehrte Bereitstellung von [H] vielversprechend. Diese stünden folglich der Bildung von Succinat durch die Malat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase zur Verfügung, sodass eine zusätzliche Generierung von [H] eine positive Auswirkung auf die Ausbeute von Succinat haben könnte.

Zunächst wurde untersucht, welches Gen des oxidativen Citratzyklus sich für eine Überexpression in diesem Zusammenhang eignen würde. Eine Transkriptanalyse der einzelnen Gene des oxidativen Citratzyklus sollte Aufschluss darüber geben, welches Gen möglicherweise durch eine geringe Transkriptmenge den „Flaschenhals“ dieses Stoffwechsel-Abschnitts darstellt. Hierfür wurde die Gesamt-RNA von in DMMG-Medium gewachsenen *P. vulgaris* Zellen extrahiert und die mRNA-Konzentration der entsprechenden Gene unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 7) über RT-qPCR bestimmt. Als Referenz wurde die Transkriptmenge des ribosomalen Proteins L23 (BVU_0803) verwendet.

Alle Schlüsselenzyme des oxidativen Citratzyklus wurden während der exponentiellen Wachstumsphase von *P. vulgaris* exprimiert. In Bezug zur mRNA-Konzentration des Referenzgens *bvu_0803* wiesen die Transkriptabundanz der untersuchten Gene zwischen 0,4-9 % der RNA-Konzentration des Referenzgens auf (Abb. 22 A). Unter Betrachtung der genomischen Anordnung der Gene, welche für die ersten drei Enzyme des oxidativen Citratzyklus kodieren (Citrat-Synthase (BVU_1961), Aconitase (BVU_1959) und Isocitrat-Dehydrogenase (BVU_1960)) wird deutlich, dass diese Gene in einem Operon vorliegen (Abb. 22 A). In diesem Zusammenhang war auffällig, dass die Transkriptmenge der Gene *bvu_1959-61* eine geringere Abundanz aufzeigten als die der Gene *bvu_0378-79* und *bvu_1163*, welche für die letzten beiden Schlüsselenzyme des oxidativen Abschnitts, α -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_0978 und BVU_0979) und Succinyl-CoA:Acetat-CoA

Transferase (SCACT; BVU_1163), kodieren (Abb. 22 A). Im Verhältnis zur Isocitrat-Dehydrogenase, bei welcher die geringste Transkriptmenge nachgewiesen wurde, war das Transkript-Level der Aconitase 2,8-mal so hoch und das Gen der Citrat-Synthase wurde dreimal mehr transkribiert. Im Vergleich dazu wurde für das kodierende Gen der α -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase eine 19-fach höhere Transkriptmenge detektiert. Die mRNA-Konzentration der SCACT war im Verhältnis zur Isocitrat-Dehydrogenase 3,5-mal so hoch.

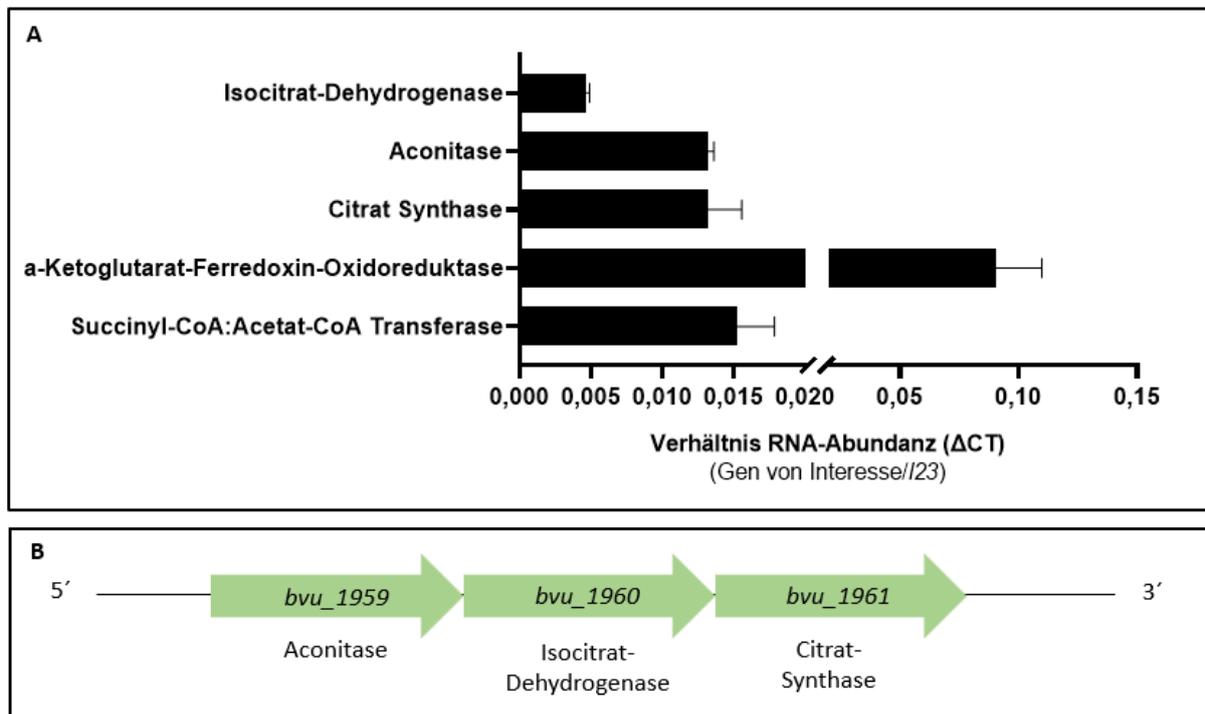


Abbildung 22: Transkriptanalyse und genomische Anordnung der Gene des oxidativen Abschnitts des nicht-geschlossenen Citratzyklus in *P. vulgatus*. (A) Die relative Transkriptmenge wurde mittels RT-qPCR analysiert. Die ΔCT -Werte stellen die Differenz des Ct-Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L23 (*bvu_0803*) dar. Für die Darstellung der mRNA-Abundanz-Unterschiede wurde die Formel $2^{-\Delta CT}$ verwendet. Das dargestellte Experiment wurde in zweifacher Ausführung mit RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. (B) Genomische Organisation des Operons *bvu_1959-61*.

Basierend auf diesen Daten konnte die Isocitrat-Dehydrogenase zumindest auf Transkript-Ebene als „Flaschenhals“ des oxidativen Citratzyklus ausgemacht werden. Durch die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase werden [H] in Form von NADH gebildet, sodass eine Überproduktion dieses Enzyms die Bereitstellung an [H] erhöhen könnte. Da die kodierenden Gene der Citrat-Synthase (*bvu_1961*), der Aconitase (*bvu_1959*) und der Isocitrat-Dehydrogenase (*bvu_1960*) in einem Operon liegen, war es offensichtlich, die drei Gene über den *shuttle*-Vektor pG106 in *P. vulgatus* zu exprimieren, um durch mehr Transkript auch die entsprechenden Enzymaktivitäten zu steigern. Für die Initiation der Transkription sollte der native Promotor des *ldh* Gens (p2499) aus *P. vulgatus* verwendet werden. Allerdings war die Klonierung und der darauffolgende Transfer des Konstrukts in *E. coli*, als auch in *V.*

wurden so ausgewählt, dass das Gen *ldh* nicht mit amplifiziert wurde, sondern nur die stromaufwärts gelegene Promotorsequenz. Die Verknüpfung beider Fragmente in der richtigen Orientierung erfolgte durch Einsatz des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes nach Angaben des Herstellers. Die fertigen Konstrukte pG106_p2499_Citrat-Synthase (Abb. 23 D), pG106_p2499_Isocitrat-Dehydrogenase (Abb. 23 E) und pG106_p2499_Aconitase (Abb. 23 F) wurden anschließend in *E. coli* λpir S17-1 mittels Hitzeschock transferiert und konnten in diesem Organismus vervielfältigt werden.

Durch Elektroporation folgte der Transfer des jeweiligen Konstrukts in *P. vulgatus*. Mittels Kolonie-PCR und unter Verwendung der Oligonukleotide screen_pG106_for und screen_pG106_rev konnte durch die zu erwartenden Fragmentgrößen von 1897 bp (Citrat-Synthase; Abb. 23 A, Spur 1), 1699 bp (Isocitrat-Dehydrogenase; Abb. 24, B, Spur 1) und 2809 bp (Aconitase; Abb. 23 C, Spur 1) die Aufnahme der einzelnen Konstrukte in *P. vulgatus* bestätigt werden. Zur Verifizierung von *P. vulgatus* wurde ein 200 bp großes Fragment amplifiziert, welches dem 16S rRNA genspezifischen Bereich des Organismus entsprach (Abb. 23 A-C, Spur 2).

Für den Nachweis, dass die klonierten Gene unter Kontrolle des stromaufwärts gelegenen *ldh* Promotors in *P. vulgatus* exprimiert werden, wurde die Transkriptabundanz der klonierten Gene untersucht. Für diese Analyse wurde die Gesamt-RNA von in BHI-Medium exponentiell gewachsenen Zellen der jeweiligen Stämme extrahiert und die mRNA-Konzentration mittels RT-qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer bestimmt (Tab. 7). Als Referenz wurde die Transkriptmenge des Gens *bvu_0803 (ribL23)* verwendet. Im Verhältnis zum Wildtyp-Stamm erreichten die jeweiligen Mutanten für die entsprechenden Gene der Aconitase, Isocitrat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase ein 300-400-fach höheres Transkript-Level. Innerhalb der Mutanten-Stämme war das Transkript-Level der einzeln überexprimierten Gene vergleichbar (Abb. 24).

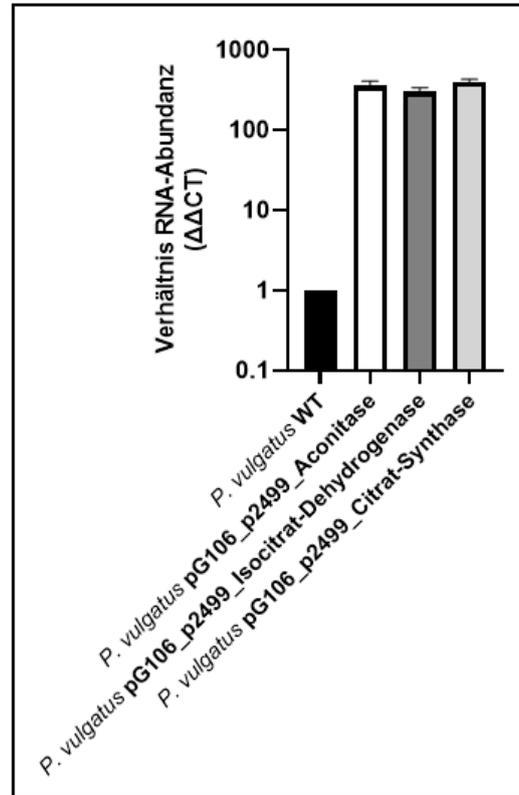


Abbildung 24: Transkriptabundanz von *bvu_1959-61* des oxidativen Citratzyklus in den entsprechenden Überexpressions-Mutanten im Verhältnis zur Expression der jeweiligen Gene in *P. vulgatus* Wildtyp. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptabundanz der klonierten Gene in den jeweiligen Mutanten-Stämmen im Verhältnis zum Wildtyp ($\Delta\Delta\text{CT}$). Für die Auswertung wurden die relativen RNA-Level von *bvu_1959/bvu_1960/bvu_1961* zunächst mit dem RNA-Level des Referenzgens verglichen (ΔCt). Anschließend wurden die jeweiligen ΔCt -Werte auf den des Wildtyps normiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Zur Berechnung wurde die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ verwendet. Das dargestellte Experiment wurde in zweifacher Ausführung mit RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Transkriptabundanz auch zu einer gesteigerten Aktivität der entsprechenden Enzyme führte und somit möglicherweise mehr Succinat über den oxidativen Ast gebildet wurde oder eine erweiterte Bereitstellung an [H] für den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus gewährleistet war, wurde die Ausbeute an Succinat betrachtet. Dafür wurden mehrere Kulturen der entsprechenden *P. vulgatus*-Stämme auf Minimalmedium mit Glucose als Substrat (20 mM) angezogen und das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte mittels HPLC analysiert. Die Überexpressions-Mutanten der Gene *bvu_1960* (Isocitrat-Dehydrogenase) und *bvu_1961* (Citrat-Synthase) produzierten mit $6,0 \pm 1,6$ mmol Succinat/g TG und $6,4 \pm 1$ mmol Succinat/g TG vergleichsweise so viel Succinat wie der Wildtyp-Stamm mit $6,0 \pm 1,8$ mmol Succinat/g TG (Abb. 25 A). *P. vulgatus* pG106_p2499_Aconitase produzierte $6,8 \pm 1,6$ mmol Succinat /g TG und somit 1,13-mal so viel Succinat wie der Wildtyp. Somit konnte in Bezug auf die Ausbeute an Succinat keine signifikante Steigerung der Succinat-Produktion erreicht werden. Im zentralen Kohlenstoffwechsel von *P. vulgatus*

kann Succinat durch Decarboxylierung weiter zu Propionat verstoffwechselt werden. Aus diesem Grund wurde auch die Bildung von Propionat durch die einzelnen Stämme betrachtet (Abb. 25 B).

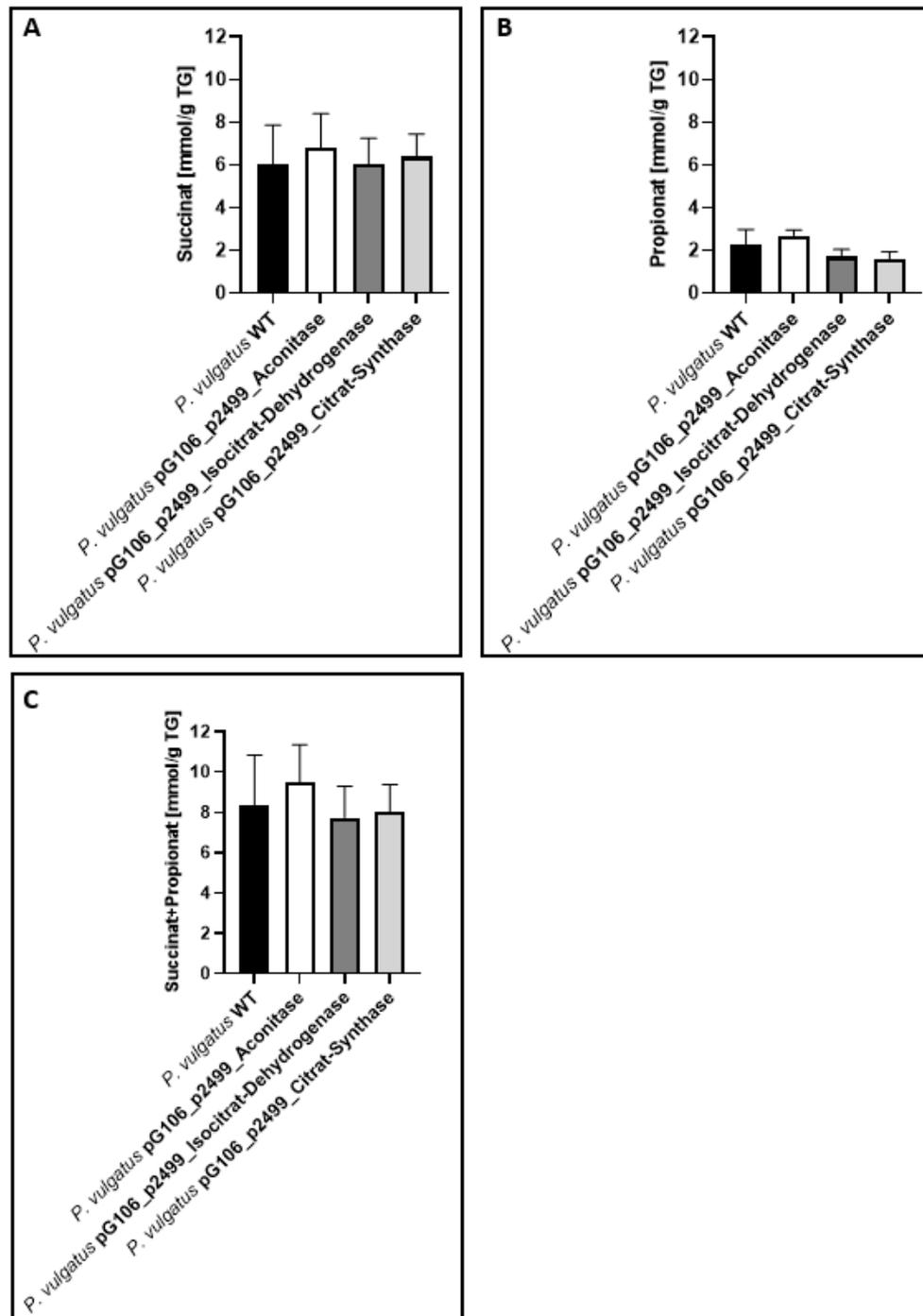


Abbildung 25: Succinat und Propionat-Bildung von *P. vulgatus* Wildtyp und den Überexpressionsmutanten des oxidativen Citratzyklus von *P. vulgatus*, während des Wachstums auf DMMG-Medium. Fünf Kulturen von jedem Stamm wurden in der exponentiellen Phase geerntet und deren Überstand mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte (A) Succinat, (B) Propionat und (C) Succinat + Propionat wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

P. vulgatus Wildtyp bildete $2,3 \pm 0,67$ mmol Propionat/g TG. Bei beiden Mutanten, welche die Gene *bvu_1960* und *bvu_1961* überproduzierten, wurde eine Propionat-Menge von $1,7 \pm 0,35$ mmol Propionat/g TG und $1,6 \pm 0,33$ mmol Propionat/g TG nachgewiesen. *P. vulgatus*, welcher vermehrt das kodierende Gen der Aconitase exprimierte, bildete mit $2,7 \pm 0,26$ mmol/g TG geringfügig mehr Propionat als der Wildtyp-Stamm. Da Propionat ein Folgeprodukt von Succinat im zentralen Kohlenstoffmetabolismus ist, können die gebildeten Mengen von Succinat und Propionat zusammen betrachtet werden (Abb. 25 C). Hierbei wurde deutlich, dass die Mutante *P. vulgatus* pG106_p2499_Aconitase insgesamt 14 % mehr Succinat (+Propionat) bildete als der *P. vulgatus* Wildtyp-Stamm. Im Vergleich dazu bildeten *P. vulgatus* pG106_p2499_Isocitrat-Dehydrogenase und *P. vulgatus* pG106_p2499_Citrat-Synthase nicht mehr Succinat (+Propionat) als *P. vulgatus* Wildtyp (Abb. 25 C).

3.6.2. Analysen des Pentosephosphatwegs in *P. vulgatus* – Überexpression von *bvu_2318*

Wie bereits erwähnt, werden für die Bildung von Succinat im Zuge der Fumarat-Atmung [H] benötigt, sodass eine erhöhte Bereitstellung von [H] durch genetische Modifikationen des Stoffwechsels die Ausbeute an Succinat begünstigen könnte. Daher wurde nach weiteren Stoffwechselwegen in *P. vulgatus* geschaut, welche maßgeblich an der Bildung von [H] beteiligt sind. Im Gegensatz zu anderen Spezies des Phylums Bacteroidota, wie *P. copri*, kodiert *P. vulgatus* alle Enzyme des oxidativen Pentosephosphatwegs (PPW), im Zuge dessen [H] gebildet werden (Franke, 2020). Der detaillierte Ablauf der PPW in *P. vulgatus* wird in Kapitel 4.4.2. beschrieben. Im Hinblick darauf, über genetische Modifikationen des PPW mehr [H] generieren zu können, wurde zunächst eine Transkriptanalyse der einzelnen Gene durchgeführt. Hierfür wurden *P. vulgatus* Zellen entweder in Minimalmedium oder PY-Komplexmedium mit Xylose oder Glucose als Substrat kultiviert. Die Gesamt-RNA der jeweils exponentiell gewachsenen Zellen wurde extrahiert und die mRNA-Konzentration mittels RT-qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer bestimmt (Tab. 7). Als Referenz wurde die Transkriptmenge des Gens *bvu_0803* (*ribL23*), welches für das ribosomale Protein L23 kodiert, verwendet.

Sowohl auf Minimalmedium (Abb. 26 A), als auch auf Komplexmedium (Abb. 26 B) wurden alle Gene des PPW in *P. vulgatus* exprimiert. Mit Glucose als Substrat erzielten die untersuchten Gene 0,5-6 % der Transkriptmenge des Referenzgens *bvu_0803*. Mit Xylose als Substrat wurde eine erhöhte Transkriptmenge der untersuchten Gene detektiert, sodass hierbei 0,9-13 % der Transkriptmenge des Referenzgens nachzuweisen war. Auffällig dabei war, dass die kodierenden Gene der Enzyme des oxidativen PPW, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und 6PGDH (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase), als auch das Gen der Transaldolase aus dem nicht-oxidativen Zweig mit Xylose als

Substrat eine deutlich höhere Transkriptabundanz im Vergleich zu Glucose als Substrat aufzeigten. Auf DMMX-Medium wurde im Vergleich zu Glucose das G6PDH-Gen 9,3-mal so viel und das Gen der 6PGDH 6,5-mal mehr transkribiert. Außerdem war das Transkript-Level der Transaldolase auf Xylose im Vergleich zur mRNA-Konzentration mit Glucose als Substrat um den Faktor 6,7 erhöht (Abb. 26 B). Auch auf PY-Medium spiegelte sich dieses Ergebnis wider. Allerdings ist hierbei anzumerken, dass die Verhältnisse der Transkriptmengen zwischen Xylose und Glucose nur halb so hoch waren (Abb. 26 B).

Weiterhin auffällig waren die Unterschiede der Transkript-Level der untersuchten Gene zwischen DMM- und PY-Medium mit Xylose als Substrat. Bei einem Wachstum der Stämme auf Minimalmedium wurde für die kodierenden Gene der Transaldolase und der G6PDH und 6PGDH ein 1,8-2,6-faches Transkript-Level im Vergleich zum Wachstum auf PYX nachgewiesen (Abb. 26 B). Im Gegensatz dazu waren die mRNA-Konzentrationen aller untersuchten Gene mit Glucose bei Wachstum auf DMM- und PY-Medium vergleichbar.

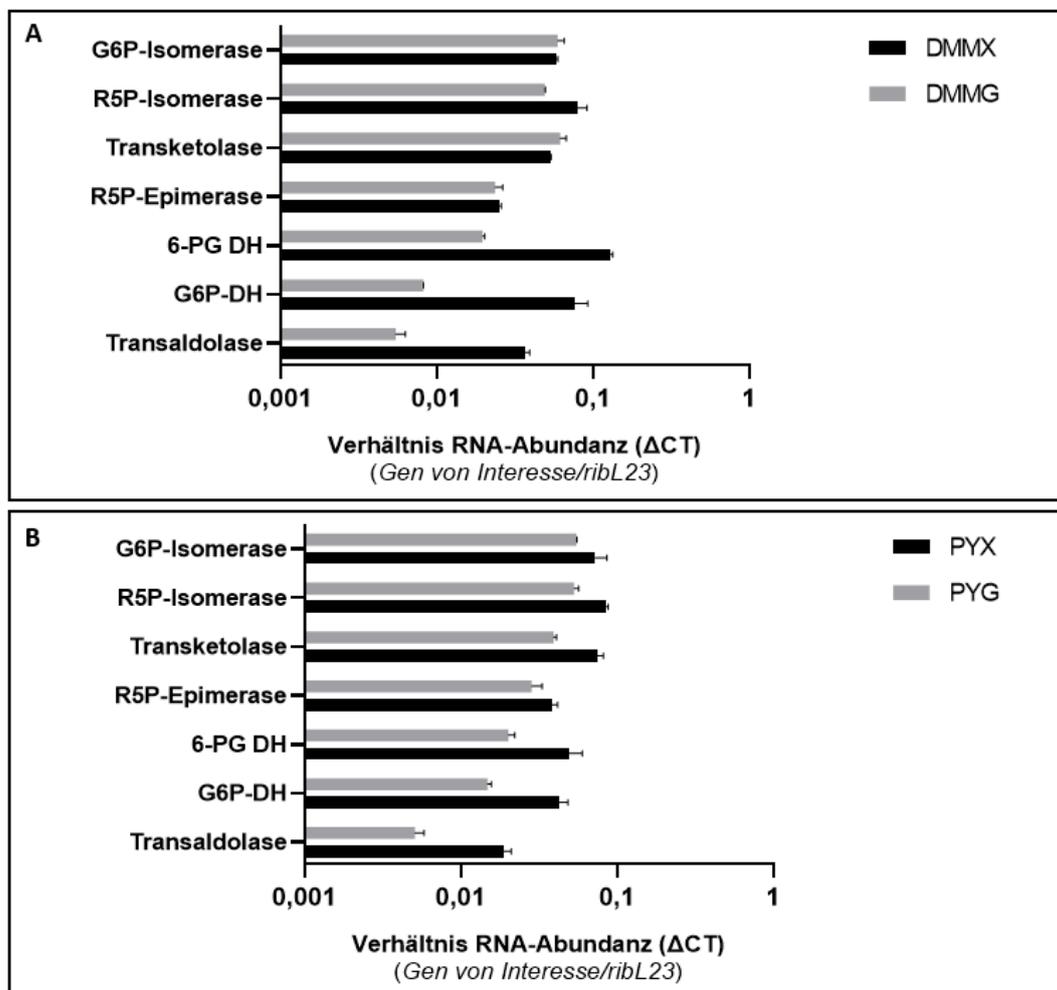


Abbildung 26: Transkriptanalyse der Gene des Pentosephosphatwegs in *P. vulgatus*. Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen der Gene von Interesse bei Wachstum auf (A) Minimal (DMM)- und (B) Komplexmedium (PY) mit Xylose und Glucose als Substrat (20 mM). Die Δ CT-Werte stellen die Differenz des Ct-

Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L23 (*bvu_0803*) dar. Für die Darstellung der mRNA-Abundanz-Unterschiede wurde die Formel $2^{-\Delta CT}$ verwendet. Die dargestellten Experimente wurden in zweifacher Ausführung mit RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse der Transkriptanalyse belegen die Relevanz des PPW bei der Verstoffwechslung von Pentosen, wie Xylose. Ebenso deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass zur Generierung von [H] beim Wachstum auf Xylose der oxidative Zweig des PPW verstärkt exprimiert wird. Dies war als Vorteil im Hinblick auf eine gesteigerte Succinat-Produktion zu werten, welche durch den reduktiven Teil des Citratzyklus katalysiert wird.

Beide Enzyme des oxidativen PPW (G6PDH und 6PGDH) erreichten auf Minimalmedium höhere Transkriptabundanzen als die Schlüsselenzyme des reduktiven PPW (Aldolase und Transketolase), weshalb G6PDH und 6PGDH keinen limitierenden Einfluss auf den Kohlenstofffluss des Stoffwechsels zu haben schienen (Abb. 26). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass durch die Überexpression der Transketolase in *E. coli* die Aktivität des PPW und damit die Ausbeute an Succinat gesteigert werden kann (Zhu *et al.*, 2014). Daher wurde die Transketolase (*BVU_2318*) für die Überproduktion in *P. vulgatus* gewählt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass mehr Kohlenstoff durch den oxidativen Zweig des PPW fließt und somit mehr [H] in Form von NADH für die Synthese von Succinat durch den reduktiven Teil des Metabolismus bereitgestellt wird. Die kodierende Sequenz der Transketolase *bvu_2318* (*tkt*) wurde aus der genomischen DNA von *P. vulgatus* mittels der Oligonukleotide *as_bvu_tkt_for* und *as_bvu_tkt_rev* (Tab. 7) vervielfältigt. Für die Amplifizierung des Plasmidrückgrats wurden die Primer *bb_pG016p2499_for* und *bb_pG016p2499_rev* (Tab. 7) eingesetzt.

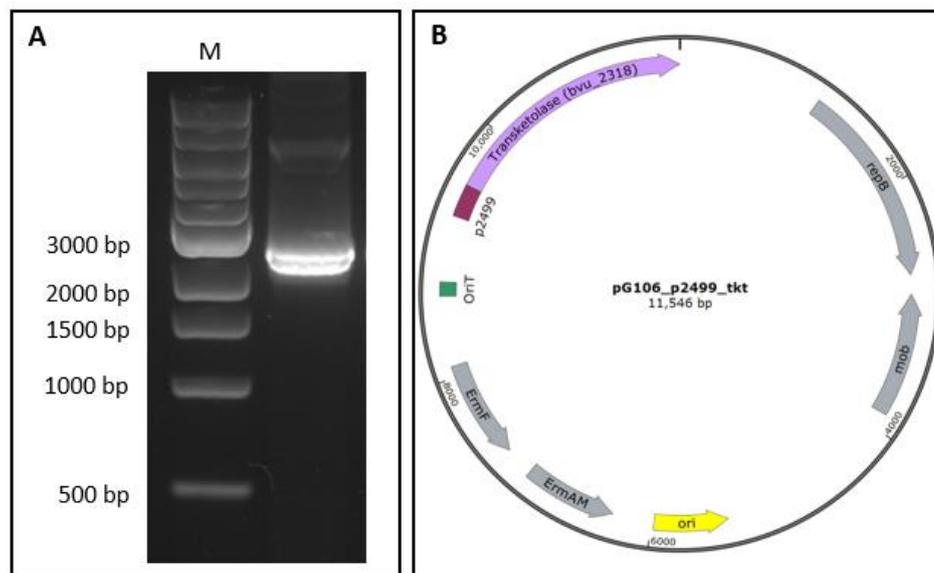


Abbildung 27: Kolonie-PCR und Plasmidkarte des erstellten Konstrukts pG106_p2499_tkt. (A) Agarosegel zum Nachweis des Transfers von pG106_p2499_tkt in *P. vulgatus*. Die verwendeten Primer *Screen_pG106_for* und

Screen_pG106_rev binden auf dem Plasmid und flankierten die klonierte Gensequenz der Transketolase (*tkl*) mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz des Gens *bvu_2499* (p2499). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (B) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pG106_p2499_tkl. Der Vektor kodiert *bvu_2318* (*tkl*) mit stromaufwärts gelegene Promotorsequenz p2499 zur Initiation der Transkription. Die 5 kb große Mob-rep-Region entspricht dem OriV (*origin of replication*) für Bacteroidota-Spezies. Die ErmF-ErmAM-Resistenzkassette dient der Selektion von *E. coli* (ErmAM) und Bacteroidota-Spezies (ErmF). OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*.

Als Template diente der Vektor pG106_ldhNP, sodass durch die Wahl der Primer die Promotorsequenz des *ldh* Gens für die Initiation der Transkription der *tkl* mit amplifiziert wurde. Es folgte die Assemblierung beider Fragmente und der Transfer des generierten Konstrukts pG106_p2499_tkl (Abb. 27 B) in *E. coli* λ pir S17-1. Mittels Elektroporation konnte das vervielfältigte Plasmid anschließend in *P. vulgatus* transferiert werden, wodurch der Stamm *P. vulgatus* pG106_p2499_tkl entstand. Durch eine Kolonie-PCR wurde das Vorhandensein des Gens *tkl* überprüft und verifiziert. Unter Verwendung der Primer Screen_pG106_for und Screen_pG106_rev (Tab. 7), welche im Plasmidrückgrat banden und die entsprechende Gensequenz flankierten, wurde die prognostizierte Fragmentgröße von 2566 bp nachgewiesen (Abb. 27 A).

Um zu überprüfen, ob der Expressions-Vektor einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *P. vulgatus* pG106_p2499_tkl hatte, wurde das Wachstumsverhalten auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Hierfür erfolgte eine Kultivierung beider Stämme in einem Plattenlesegerät. Im Vergleich zum Wildtyp wies *P. vulgatus* pG106_p2499_tkl eine verlängerte Lag-Phase auf. Dennoch zeigten beide Stämme eine typische exponentielle Wachstumsphase und erzielten eine maximale OD₆₀₀ von 1 (Abb. 28). Die Verdopplungszeit von *P. vulgatus* Wildtyp betrug $0,75 \pm 0,05$ h und die der Überexpressionsmutante $0,92 \pm 0,1$ h (Abb. 28).

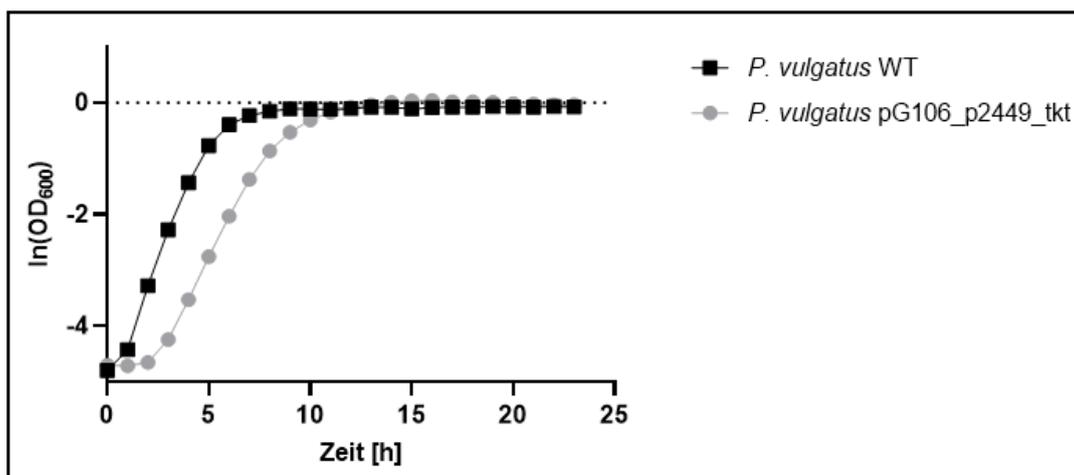


Abbildung 28: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_p2499_tkl in DMMX-Medium. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMX-Medium wurde 1 % [v/v] mit Vorkultur beimpft.

Um den Einfluss der Überexpression des *tkt* Gens auf die Transkriptabundanz der einzelnen Gene des PPW beurteilen zu können, wurde eine Transkriptanalyse durchgeführt. Hierbei lag das Augenmerk vor allem auf dem Verhältnis der mRNA-Konzentration von chromosomal und Plasmid kodierten *tkt* des Expressionsstamms und chromosomal kodierten *tkt* des Wildtyps. Die Gesamt-RNA, von in DMMX-Medium exponentiell gewachsenen Zellen der jeweiligen Stämme, wurde extrahiert und die mRNA-Konzentration mittels RT-qPCR bestimmt. Als Referenz wurde die Transkriptmenge des Gens *bvu_0803* (*ribL23*) verwendet.

Für einen ersten Einblick wurden zunächst die relativen RNA-Level der Gene des PPW mit dem RNA-Level des Referenzgens verglichen (ΔCt ; Abb. 29). Auffällig war die Transkriptabundanz des Transketolase-Gens *tkt* in *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt. Diese war 1,5-fach höher als die des Referenzgens. Im Vergleich dazu wies der Wildtyp-Stamm nur ein halb so hohes Transkript-Level von *tkt* im Verhältnis zum Referenzgen auf. Die mRNA-Konzentrationen der übrigen Gene von Interesse waren in der Überexpressions-Mutante deutlich niedriger als die Transkriptmenge von *bvu_0803*. Die Transkriptmengen lagen dabei zwischen 5-12 % der mRNA-Konzentration des Referenzgens. Neben dem signifikanten Unterschied der Transkriptabundanz von *tkt* zwischen Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt war außerdem das unterschiedliche Transkript-Level der kodierenden Gene für Transaldolase, RP5-Epimerase und G6P-Isomerase zwischen beiden Stämmen auffällig. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Transkriptmengen der untersuchten Gene der Mutante auf die entsprechenden RNA-Konzentrationen des Wildtyps normalisiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$; Abb. 29 A).

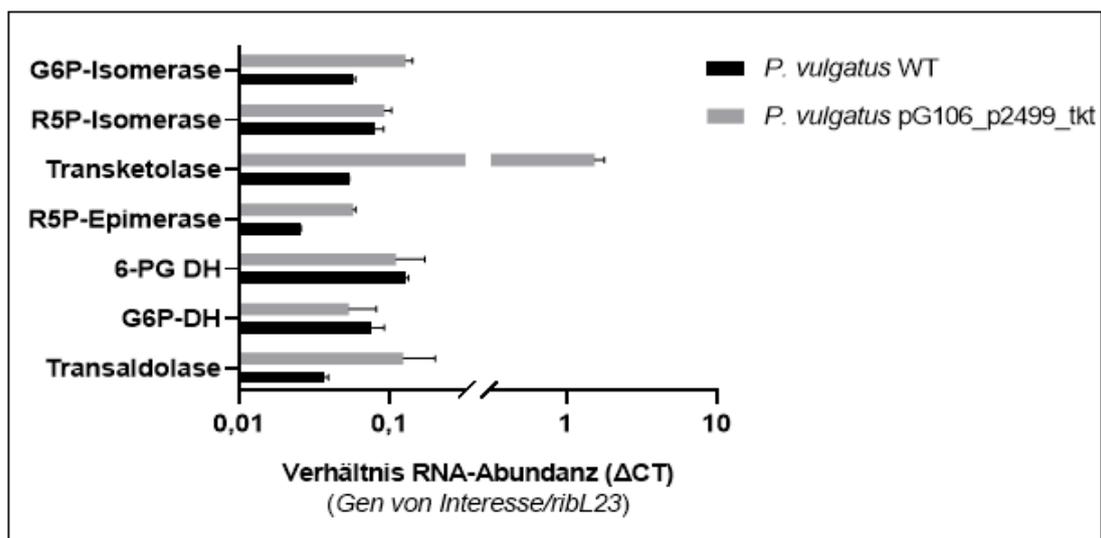


Abbildung 29: Transkriptanalyse der Gene des PPW in *P. vulgatus* und der Expressions-Mutante *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt. Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen der Gene von Interesse. ΔCt -Werte spiegeln die Differenz des Ct-Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L23 (*bvu_0803*) wider. Für die Darstellung der mRNA-Abundanz-Unterschiede wurde die Formel $2^{-\Delta\text{CT}}$ verwendet.

Die dargestellten Experimente wurden in zweifacher Ausführung mit RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Abbildung 30 veranschaulicht, dass die Transkript-Level der Gene des oxidativen PPW (*bvu_2975* und *bvu_2976*) in *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt, als auch das kodierende Gen der RP5-Isomerase des reduktiven PPW, vergleichbar waren.

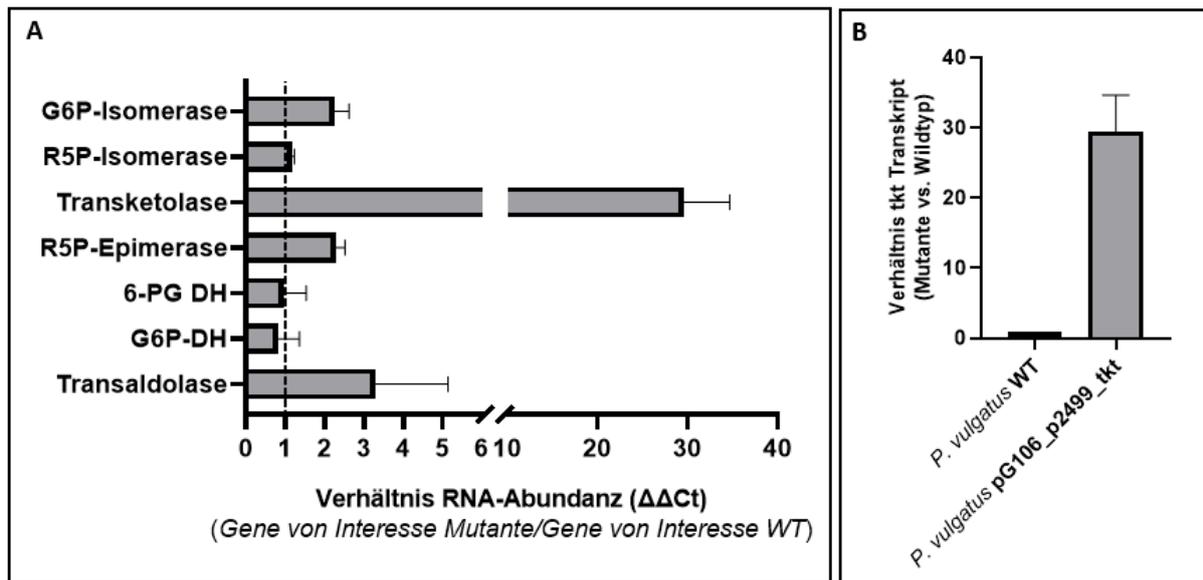


Abbildung 30: Transkriptanalyse der Gene des PPW von *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt normiert auf die des Wildtyps. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptabundanz (A) aller Gene von Interesse und (B) des überexprimierten *tkt*-Gens im Verhältnis zum Wildtyp ($\Delta\Delta Ct$). Zur Berechnung wurde die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verwendet. Das dargestellte Experiment wurde in zweifacher Ausführung mit RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Dahingegen waren die mRNA-Konzentrationen der kodierenden Gene der Transaldolase, RP5-Epimerase und G6P-Isomerase in *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt 2-3-mal höher, verglichen mit denen des Wildtyps. Das Gen der Transketolase wurde durch die Überexpressions-Mutante vergleichsweise 29-mal stärker transkribiert (Abb. 30 B).

Aufgrund der erhöhten Transkriptmenge von *tkt* wurde untersucht, ob dies einen Einfluss auf die Bildung von [H] und folglich auf die Succinat-Ausbeute hatte. Dafür wurden mehrere Kulturen der entsprechenden *P. vulgatus*-Stämme auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat (20 mM) angezogen und das Verhältnis der Stoffwechselprodukte mittels HPLC analysiert. Der größte Unterschied zeigte sich in Bezug auf die Bildung von Succinat. Der Wildtyp-Stamm von *P. vulgatus* produzierte $3,9 \pm 0,8$ mmol Succinat /g TG. Bei *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt hingegen wurde eine Konzentration von

5,3 ± 1 mmol Succinat/g TG nachgewiesen. Somit produzierte die Expressions-Mutante 35 % mehr Succinat als der Wildtyp (Abb. 31 A).

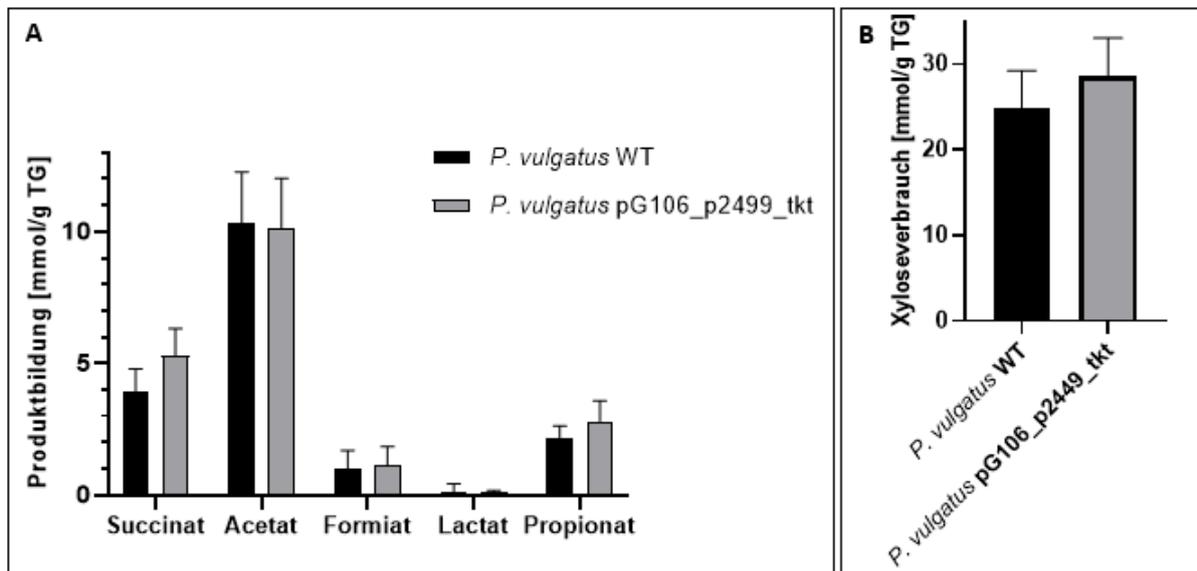


Abbildung 31: Produktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* Wildtyp *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt. 16 Kulturen beider Stämme wurden auf DMMX-Medium kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet und der Überstand der Kulturen mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der (A) Stoffwechselprodukte und (B) des Substratverbrauchs wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Ein geringer Unterschied konnte auch beim Substratverbrauch beider Stämme verzeichnet werden (Abb. 31 B). Während der Wildtyp 24,8 ± 4,8 mmol Xylose/g TG verbrauchte, verstoffwechselte *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt 28,6 ± 4,4 mmol Xylose/g TG (Abb. 31 B). Die detektierten Konzentrationen der Stoffwechselprodukte Acetat, Formiat und Lactat waren zwischen beiden Stämmen vergleichbar (Abb. 31 A).

Wie bereits erwähnt, kann Succinat im zentralen Kohlenstoffwechsel von *P. vulgatus* durch Decarboxylierung weiter zu Propionat verstoffwechselt werden. Aus diesem Grund war für die Bewertung der Succinat-Ausbeute ebenfalls die gebildete Propionat-Menge beider Stämme von Bedeutung. Mit Xylose als Substrat produzierte die Mutante 28 % mehr Propionat als der Wildtyp (2,18 mmol/g TG; Abb. 34 B). Zusammengefasst ergab sich eine Succinat-Ausbeute (+Propionat) von 8 mmol Succinat/g TG, produziert durch *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt. Im Verhältnis zum Wildtyp konnte somit die Ausbeute an Succinat um 35 % gesteigert werden (Abb. 32 C).

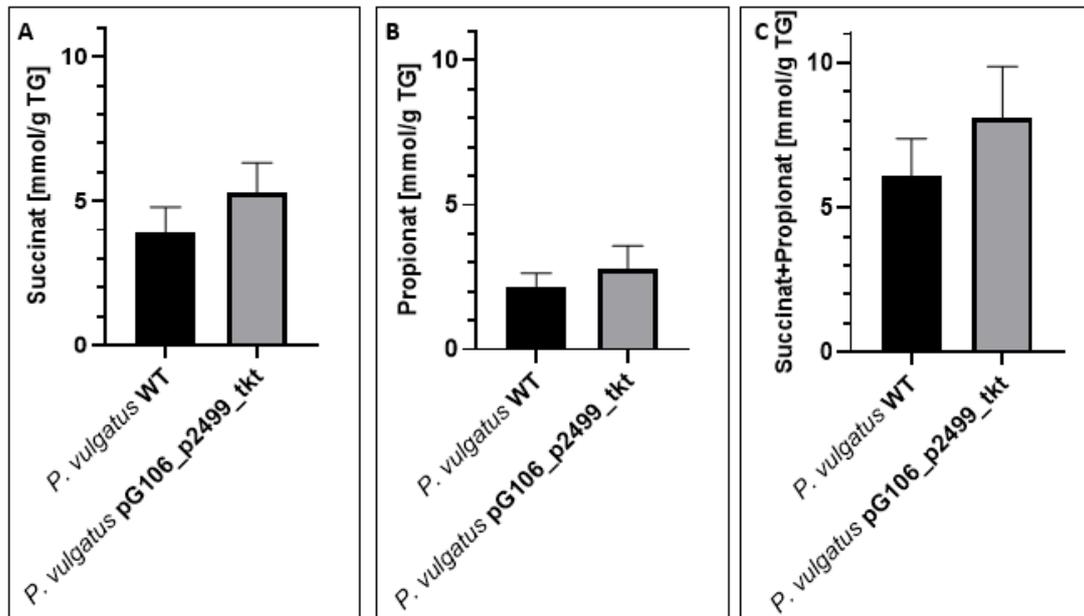


Abbildung 32: Succinat und Propionat-Bildung von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt, während des Wachstums auf DMMX-Medium. 16 Kulturen beider Stämme wurden in der exponentiellen Phase geerntet und der Überstand der Kulturen mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte (A) Succinat, (B) Propionat und (C) Succinat + Propionat wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Die vorliegenden Ergebnisse aus Kapitel 3.6 belegen, dass durch die Etablierung eines genetischen Systems, basierend auf dem *shuttle*-Vektor pG106, eine homologe Überexpression verschiedener Gene aus dem Stoffwechsel von *P. vulgatus* möglich war. Es zeigte sich, dass mit diesem Werkzeug der Kohlenstoffmetabolismus des Organismus gezielt manipuliert und das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte zu Gunsten von Succinat verschoben werden konnte. Somit wurde durch die Überproduktion von Enzymen des nicht-geschlossenen Citratzyklus und des PPW in *P. vulgatus* die Succinat-Ausbeute gesteigert. Zusammenfassend eröffnet die Etablierung dieses Systems die Tür für eine zukünftig biotechnologische Anwendung von *P. vulgatus* als effizienter Succinat-Produzent.

3.6.3. Untersuchung der Bildung von Reduktionsäquivalenten durch die Enzyme des oxidativen Pentosephosphatwegs in *P. vulgatus*

Da für die Bildung von Succinat [H] in Form von NADH benötigt werden, wurde im Folgenden dieser Arbeit untersucht, ob NADH oder NADPH durch die Enzyme G6PDH und 6PGDH des oxidativen PPW gebildet werden. Für den Nachweis der entsprechenden Enzymaktivität, sowie der Spezifität bezüglich der Coenzyme, wurden die Gene *bvu_2975* (kodiert 6PGDH) und *bvu_2976* (kodiert G6PDH) jeweils in einen pASK-5 Vektor kloniert (Tab. 7) und die generierten Konstrukte in *E. coli* DH5 α transferiert. Mittels Kolonie-PCR konnte die korrekte Assemblierung und Aufnahme der Plasmide bestätigt werden.

Unter Verwendung der Primer pASK_for und pASK_rev (Tab. 7) wurden für die Konstrukte pASK5_bvu_2796 und pASK5_bvu_2795 die zu erwartenden Bandengrößen 1732 bp (Abb. 33 A) und 1625 bp (Abb. 33 B) vervielfältigt.

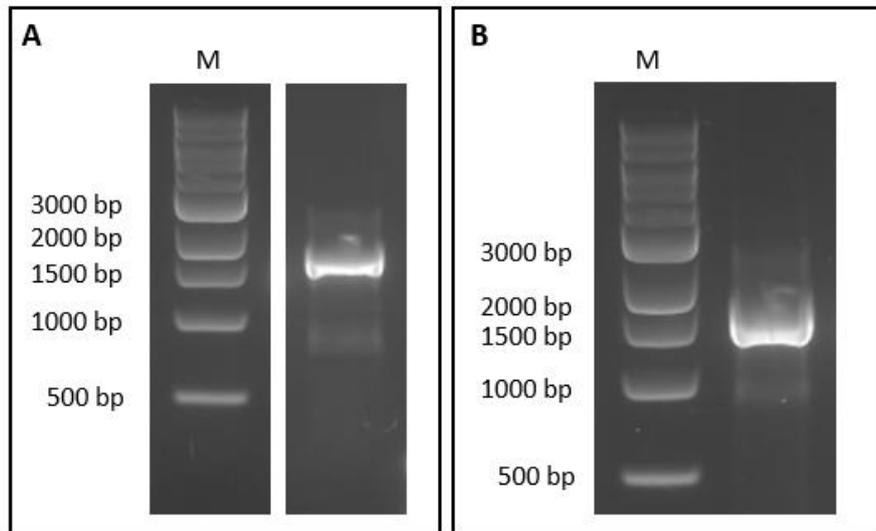


Abbildung 33: Kolonie-PCR der Konstrukte pASK5_bvu_2975 und pASK5_bvu_2976. (A) Kolonie-PCR zum Nachweis des Transfers von pASK5_bvu_2976 in *E. coli* DH5 α . Amplifikat mit der erwarteten Fragmentgröße von 1732 bp. (B) Kolonie-PCR zum Nachweis des Transfers von pASK5_bvu_2975 in *E. coli*. Amplifikat mit der erwarteten Fragmentgröße von 1625 bp. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Anschließend wurden die heterolog produzierten Enzyme G6PDH und 6PGDH über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Coenzym-Spezifität gegenüber NAD^{*}/NADP^{*} untersucht. Die Analyse erfolgte photometrisch durch den Nachweis der Absorptionsänderung von NADPH/NADP⁺ bzw. NADH/NAD⁺ bei einer Wellenlänge von 340nm. Für die Ermittlung der Affinität des Enzyms zum entsprechenden Cofaktor wurde die Menge an NADP^{*}/NAD^{*} (0-8 mM) variiert. Die Messungen erfolgten beim optimalen pH-Wert von 8 und physiologischer Temperatur von *P. vulgatus* (37 °C) und die kinetischen Parameter wurden aus der nicht linearen Regression der Michaelis-Menten-Daten bestimmt (Abb. 34). Die gesamten Daten sind in Tabelle 21 dargestellt.

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass sowohl die G6PDH als auch die 6PGDH die Coenzyme NAD⁺ und NADP⁺ für die Umwandlung des entsprechenden Substrats reduzieren konnten. Allerdings wies die G6PDH eine höhere spezifische Aktivität mit NADP⁺ ($7,8 \pm 0,42$ U/mg), im Vergleich zu NAD⁺ ($2,6 \pm 0,08$ U/mg) als Coenzym, auf. Die Affinität für NADP⁺ ($K_M = 0,044 \pm 0,003$ mM; Abb. 34 A) war hierbei 60-fach höher als für NAD⁺ ($K_M = 2,6 \pm 0,04$ mM; Abb. 34 C), sodass die G6PDH eine 177-fache katalytische Effizienz mit NADP⁺ als Coenzym aufzeigte.

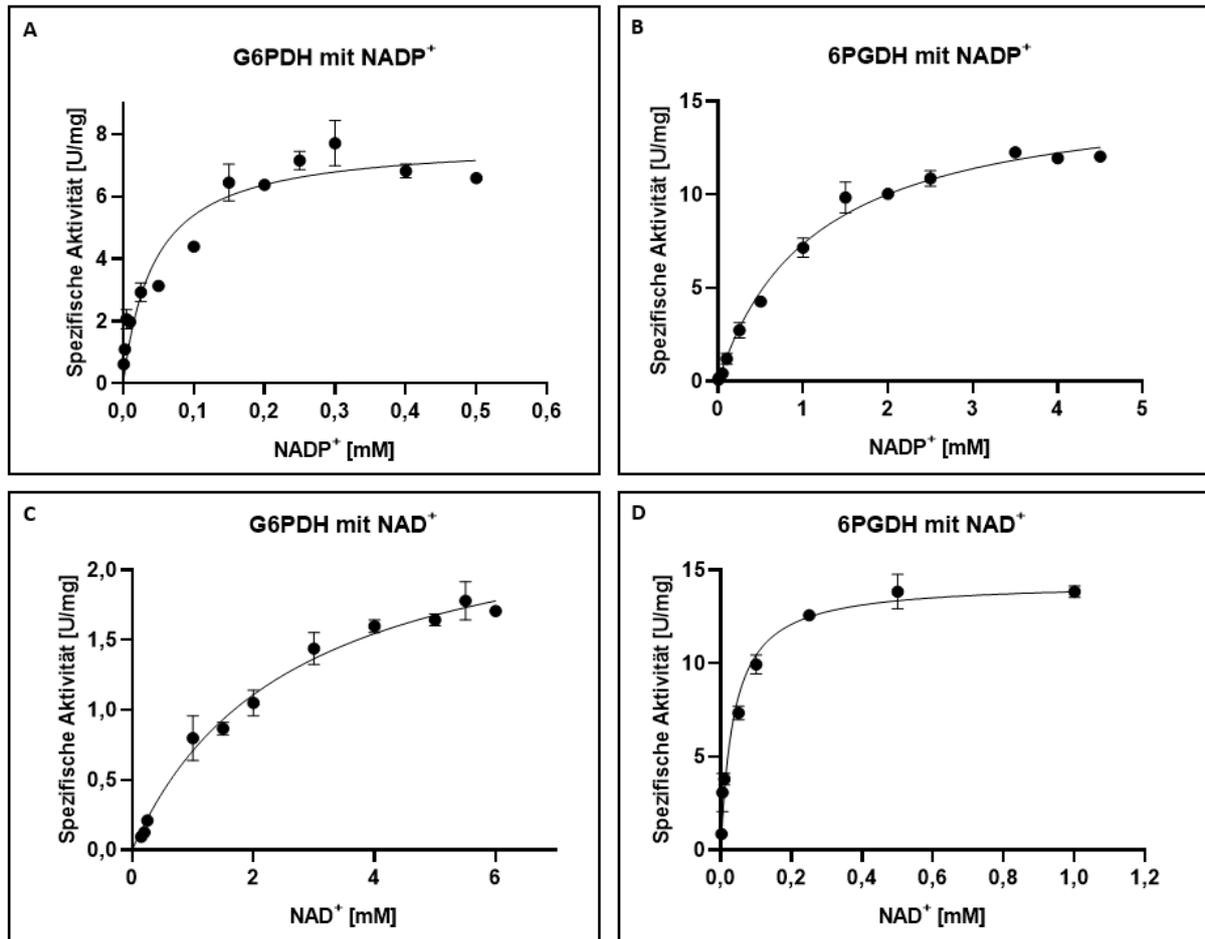


Abbildung 34: Michaelis-Menten-Kinetik zur Ermittlung der Coenzym-Spezifität von G6PDH (BVU_2796) und 6PGDH (BVU_2795) aus *P. vulgatus*. Dargestellt werden die ermittelten spezifischen Aktivitäten [U/mg] bezogen auf das untersuchte Coenzym [mM]. Die Reaktionen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 8 durchgeführt. Zur Herstellung des kinetischen Modells wurde die Aktivität der beiden Enzyme mit verschiedenen Konzentrationen an NAD⁺ und NADP⁺ getestet. Die Aktivitätsmessungen erfolgte bei 340 nm. (A) G6PDH mit NADP⁺. (B) 6PGDH mit NADP⁺. (C) G6PDH mit NAD⁺. (D) 6PGDH mit NAD⁺.

Es stellte sich heraus, dass für die 6PGDH umgekehrte Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Die Affinität zu NAD⁺ ($K_M = 0,037 \pm 0,003$; Abb. 34 D) war hierbei im Vergleich zu NADP⁺ 31-mal höher ($K_M = 1,13 \pm 0,24$; Abb. 34 B). Schlussendlich war die katalytische Effizienz der 6PGDH mit NAD⁺ als Coenzym um das 26-fache höher, als mit NADP⁺.

Tabelle 21: Kinetische Parameter der Enzyme G6PDH (BVU_2796) und 6PGDH (BVU_2795) aus *P. vulgatus*.

Coenzym	G6PDH				6PGDH			
	K_M (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_M	K_M (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_M
NADP ⁺	0,044 ± 0,003	7,8 ± 0,42	7,6 ± 0,4	173,8 ± 2,6	1,13 ± 0,24	15,7 ± 1	13,8 ± 0,9	12,2 ± 1,8
NAD ⁺	2,6 ± 0,04	2,6 ± 0,08	2,54 ± 0,08	0,98 ± 0,02	0,037 ± 0,003	14,4 ± 0,6	11,75 ± 0,6	317,7 ± 12,7

Die dargelegten Ergebnisse deuten darauf hin, dass über den oxidativen Teil des PPW von *P. vulgatus* sowohl NADH als auch NADPH generiert werden. Damit NADPH für die Produktion von Succinat genutzt werden kann, ist die Umwandlung zu NADH durch die Aktivität einer Transhydrogenase nötig (wird in Kapitel 4.4.2. erläutert).

3.7. Deletion von Genen des Zentralmetabolismus von *P. vulgatus* zur Steigerung der Succinat-Ausbeute

Der Stoffwechsel von Mikroorganismen, welche in der Biotechnologie als effiziente Produzenten von Plattformchemikalien, wie Succinat, eingesetzt werden, wird in der Regel genetisch modifiziert, um die Produktausbeute zu optimieren (*genetic engineering*). Neben der Überexpression von Genen, beispielsweise Succinat-bildender Stoffwechselwege, steht vor allem die Deletion von Genen konkurrierender Stoffwechselwege, die zur Bildung von Nebenprodukten führen, im Vordergrund.

In dieser Arbeit wurde für die markerlose Deletion von Genen aus dem Stoffwechsel von *P. vulgatus* der Deletionsvektor pMM656_SacB verwendet. Das Plasmid wurde von Herrn André Neff (Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Der Gegenselektionsmarker dieses Plasmids basiert auf dem Protein SacB, welches ursprünglich aus *B. subtilis* stammt und für eine Levansucrase kodiert. Durch die Hydrolyse von Saccharose katalysieren Levansucrasen (EC 2.4.1.10) die Synthese von Levan, ein komplexes Polysaccharid, welches aus β -D-Fructose-Einheiten mit einem endständigen Glucose-Molekül aufgebaut ist (Ried und Collmer, 1987). Eine intrazelluläre Akkumulation von Levan hat einen letalen Effekt auf den Organismus, weshalb *sacB* unter der Zugabe von Saccharose als Substrat, als Gegenselektionsmarker Anwendung findet.

Im Folgenden wird der grundsätzliche Ablauf der markerlosen Deletion mit pMM656_sacB als Deletionsvektor in *P. vulgatus* beschrieben: 1000 bp des *up-* und *downstream-*Bereichs des zu deletierenden Gens wurden in den Deletionsvektor pMM656_SacB kloniert (Abb. 35 A). Der Transfer des Vektors in den Rezipienten-Stamm *P. vulgatus* erfolgte durch biparentale Konjugation mit dem entsprechenden Donorstamm *E. coli* β 2155. Da *E. coli* β 2155 Diaminopimelinsäure (DAP)-auxotroph ist, erfolgte das *mating* beider Stämme auf BHI-Agarplatten unter Zugabe von 0,3 mM DAP. Die anschließende Selektion der ersten homologen Rekombination wurde auf BHI-Agarplatten mit 100 μ g/ml Erythromycin und 200 μ g/ml Gentamycin durchgeführt (Abb. 35).

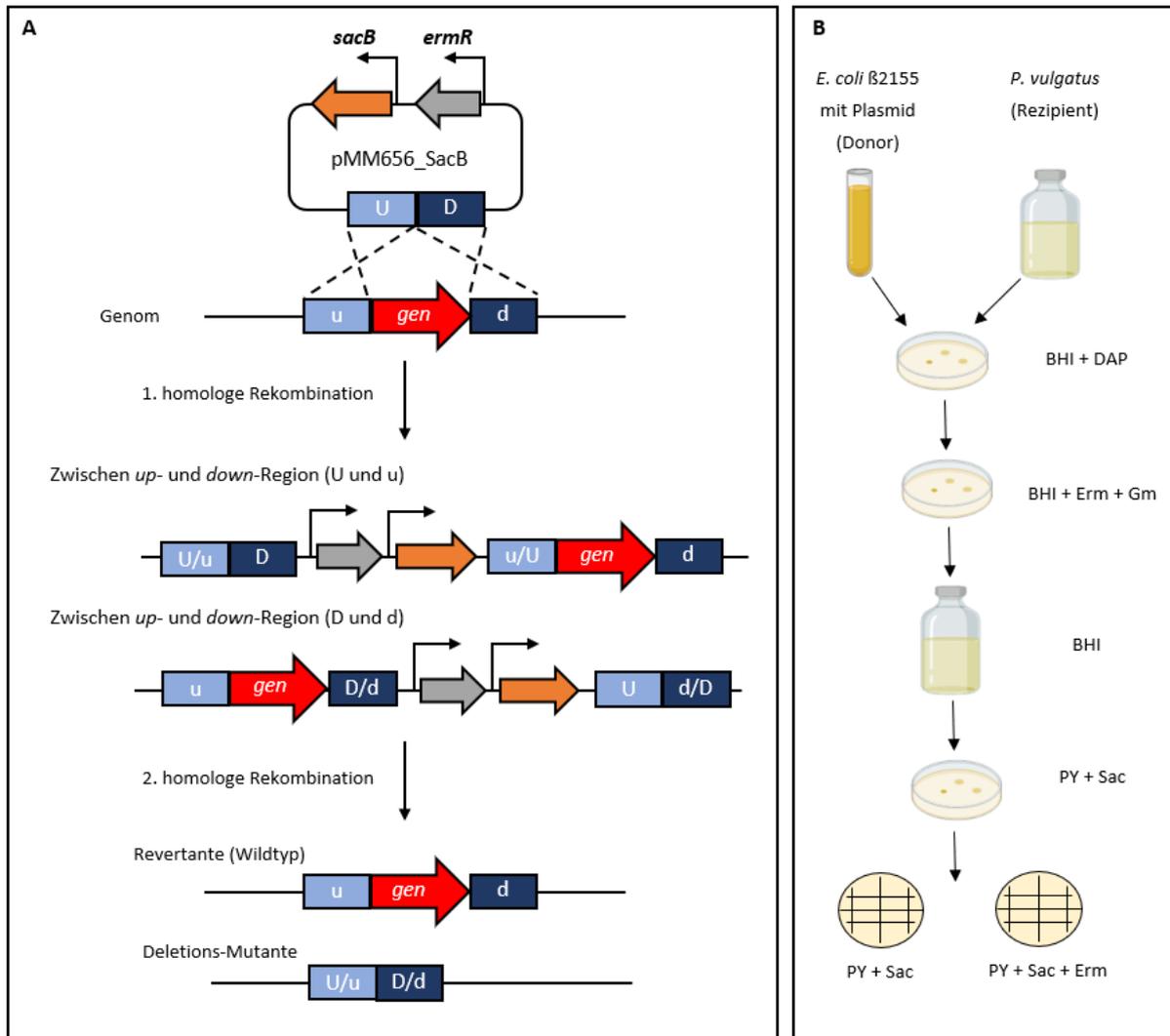


Abbildung 35: Schematische Darstellung der markerlosen Deletion. (A) Dargestellt ist die Integration des Deletionsvektors pMM656_SacB exemplarisch in das Genom durch Rekombination des *up*- oder *downstream*-Bereichs des zu deletierenden Gens. (B) Dargestellt ist der Ablauf der markerlosen Deletion mit *E. coli* B2155 als Donorstamm und *P. vulgatus* als Rezipient. DAP = Diaminopimelinsäure; Sac = Saccharose; Erm = Erythromycin; Gm = Gentamycin.

Erythromycin wurde hierbei zur Selektion von *P. vulgatus* eingesetzt und Gentamycin zur Gegenselektion des *E. coli*-Stamms. *P. vulgatus* ist von Natur aus resistent gegenüber Gentamycin. Da der Deletionsvektor im Empfängerorganismus nicht replizierbar ist, wuchsen ausschließlich Zellen auf den Selektionsagarplatten, die den Vektor über eine erste homologe Rekombination vollständig in das Genom integrieren konnten. Durch eine Kolonie-PCR wurden gewachsene Kolonien auf das Vorhandensein des Gegenselektionsmarker *sacB* überprüft. Klone, bei denen das entsprechende Fragment nachgewiesen wurde und damit eine erste homologe Rekombination durchgeführt hatten, wurden für den Vorgang der zweiten homologen Rekombination eingesetzt. Diese erfolgte ohne die Zugabe von Antibiotikum in BHI-Medium für 4 h und anschließend durch eine Gegenselektion auf 150 mM Saccharose haltigen PY-Agarplatten (Abb. 35 B). Im Zuge der zweiten homologen Rekombination

wurde der Vektor über die homologen *up*- bzw. *downstream*-Regionen wieder aus dem Genom des Organismus entfernt. Daraus resultierend entstanden entweder Wildtyp-Revertanten oder unter Austausch des Zielgens die gewünschte Deletionsmutante (Abb. 35 A). Für eine Gegenselektion wurden gewachsene Kolonien auf PY + Saccharose und PY + Saccharose + Erythromycin haltigen Agarplatten kultiviert (Abb. 35 B). Durch eine abschließende Kolonie-PCR wurden auf PY-Saccharose gewachsene Kolonien auf den Verlust des zu deletierenden Gens überprüft und durch Sequenzierung der Verlust des Gens bestätigt.

3.7.1. Konstruktion von *P. vulgatus* Δ 0984 und Δ 3649

Neben der markerlosen Gendeletion zur Steigerung der Succinat-Produktion, stand in dieser Arbeit auch die Etablierung weiterer Werkzeuge zur genetischen Modifizierung, wie die Erweiterung von Gegenselektionsmarkern, zur Anwendung in *P. vulgatus* im Fokus. In vielen bakteriellen markerlosen Deletionssystemen werden Gene des Purin- und Pyrimidin Metabolismus, vor allem für Phosphoribosyltransferase (*upp*) kodierende Gene, zur Gegenselektion eingesetzt. Das allgemeine Prinzip ist die enzymatische Umwandlung von Fluor-haltigen Purin- oder Pyrimidin-Analoga (z.B. 5-Fluoruracil) in Produkte, welche für die Zelle toxisch sind. Organismen, denen das betreffende Enzym fehlt, sind resistent gegenüber diesem toxischen Analogon. Eine Plasmid-kodierte Kopie des entsprechenden Gens kann somit als Gegenselektionsmarker eingesetzt werden. Da *P. vulgatus* ein Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase) chromosomal kodiertes Gen (*bvu_0984*, *upp*) besitzt, sollte dieses unter Anwendung des markerlosen Deletionsverfahrens auf Grundlage von *sacB* deletiert werden, um somit einen Stamm zu generieren, auf dessen Grundlage *upp* als zukünftiger Gegenselektionsmarker genutzt werden könnte.

Für eine markerlose Deletion von *bvu_0984* (*upp*) wurden zunächst 1000 bp der *up*- und *downstream* flankierenden Sequenzbereiche des *upp* Gens in den Deletionsvektor pMM656_SacB kloniert. Die Amplifizierung der entsprechenden Sequenzen erfolgte durch Verwendung der Oligonukleotide *as_656SacB_up_BVUupp_for* und *as_656SacB_up_BVUupp_rev* (*upstream*-Sequenz), sowie *as_656SacB_do_BVUupp_for* und *as_656SacB_do_BVUupp_rev* (*downstream*-Sequenz) (Tab. 7). Das Plasmidrückgrat wurde mittels der Primer *bb_pMM656SacB_fw* und *bb_pMM656SacB_rev* (Tab. 7) generiert. Anschließend erfolgte die Assemblierung der drei Fragmente durch Einsatz des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes. Das generierte Konstrukt pMM656_sacB_Δ0984 (Abb. 36 C) wurde mittels Hitzeschock in *E. coli* β 2155 transferiert und die korrekte Assemblierung mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung verifiziert. Der Transfer des Deletionsvektors pMM656_sacB_Δ0984 in *P. vulgatus* erfolgte durch biparentale Konjugation mit *E. coli* β 2155 als Donorstamm. Der Nachweis der ersten

homologen Rekombination erfolgte durch eine Kolonie-PCR, mit der das Vorhandensein des im Vektorrückgrat befindlichen Gens *sacB* überprüft wurde. Unter Verwendung der Primer *screen_pMM656_SacB_for* und *screen_pMM656_SacB_rev* (Tab. 7) wurde die prognostizierte Fragmentgröße von 2000 bp nachgewiesen (Abb. 36 B, Spur 2). Beim Wildtyp-Stamm konnte kein entsprechendes Fragment detektiert werden (Abb. 36 A, Spur 2). Unter Verwendung der Oligonukleotide *qPCR_upp_for* und *qPCR_upp_rev* (Tab. 7) wurde jeweils ein Fragment von 200 bp amplifiziert. Da diese Oligonukleotide im Gen *bvu_0984* binden, lieferte dies den Nachweis, dass das *upp* Gen im Genom beider Stämme vorlag (Abb. 36 A-B, Spur 1).

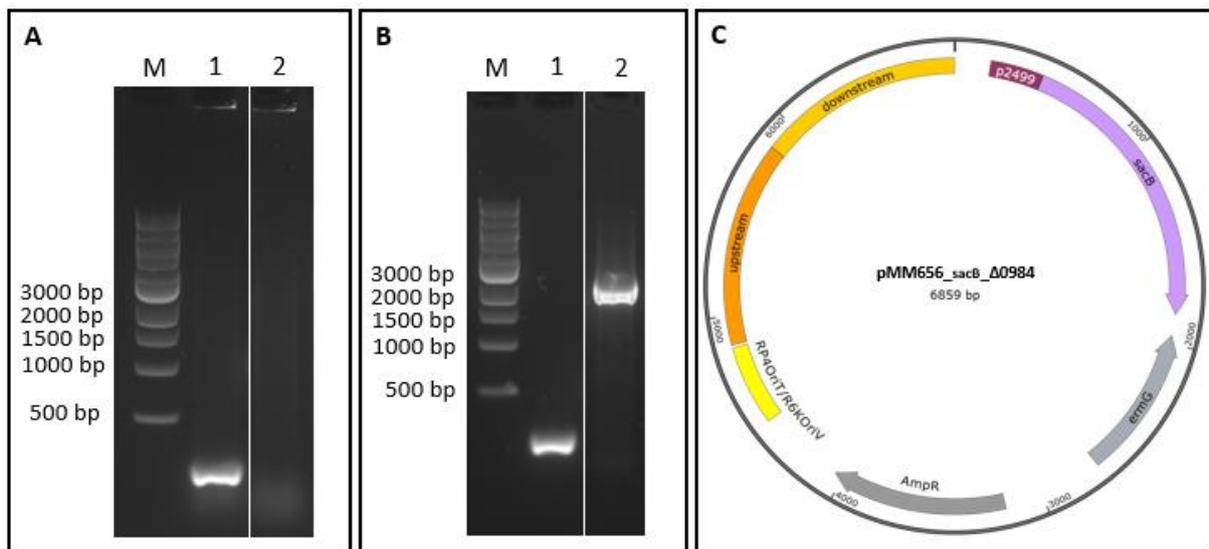


Abbildung 36: Kolonie-PCR zum Nachweis der ersten homologen Rekombination von pMM656_sacB_Δ0984 in das Genom von *P. vulgatus*. (A)-(B) Agarosegel zum Nachweis von *bvu_0984* (Spur 1) und *sacB* (Spur 2) in (A) *P. vulgatus* Wildtyp und (B) Kolonien der ersten homologen Rekombination. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (C) Plasmidkarte von pMM656_sacB_Δ0984 für die Deletion des Gens *bvu_0984* in *P. vulgatus*. Darauf befindet sich neben den *up*- und *downstream* flankierenden Bereichen zudem eine Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR), eine Erythromycin-Resistenzkassette (*ermG*) und ein *sacB*-Gen als Gegenselektionsmarker. Die Transkription von *sacB* wird durch den Promotor des Gens *bvu_2499* (p2499) initiiert.

Nach Durchführung der zweiten homologen Rekombination konnten auf den Agarplatten mit Saccharose zur Gegenselektion ebenfalls Kolonien detektiert werden. Saccharose konnte durch die heterolog produzierte Levansucrase (*SacB*) zu intrazellulär toxischem Levan umgewandelt werden. Nur Zellen, in denen durch eine zweite homologe Rekombination ein spontaner Verlust dieses Gens aus der genomischen DNA erfolgte, konnten auf dem Nährboden wachsen. Durch eine Kolonie-PCR wurde bestätigt, dass *sacB* nicht mehr im Genom dieser Kolonien vorhanden war. (Abb. 37 B, Spur 3). Ebenso konnte kein korrespondierendes Fragment für *bvu_0984* amplifiziert werden (Abb. 37 B, Spur 1). Um zwischen Revertante und Mutante unterscheiden zu können, wurde eine Kolonie-PCR zum Nachweis des Gens *upp* durchgeführt. Unter Einsatz der Primer *seq_up_bvu0984_fw* und *seq_do_bvu0984_rev*

(Tab. 7), welche im *up*- und *downstream*-Sequenzbereich des Gens binden und somit dieses flankieren, wurde bei einer Deletion eine Fragmentgröße von 683 bp vorhergesagt. Lag der Wildtyp vor, war eine Fragmentgröße von 1343 bp zu erwarten. Durch den Nachweis eines etwa 1300 bp großen Amplifikats beim Wildtyp (Abb. 37 A, Spur 2) bzw. 680 bp bei der Mutante (Abb. 37 B, Spur 2), konnte die Deletion von *bvu_0984* auf Genomebene bestätigt werden. Um dies auch auf Sequenzebene nachzuweisen, folgte die Sequenzierung des Genomabschnitts unter Verwendung der Primer *seq_up_bvu0984_fw* und *seq_do_bvu0984_rev*. Dadurch konnte bestätigt werden, dass *bvu_0984* aus dem Genom von *P. vulgatus* markerlos deletiert (Abb. 37 C) und so die Deletionsmutante *P. vulgatus* Δ 0984 generiert wurde.

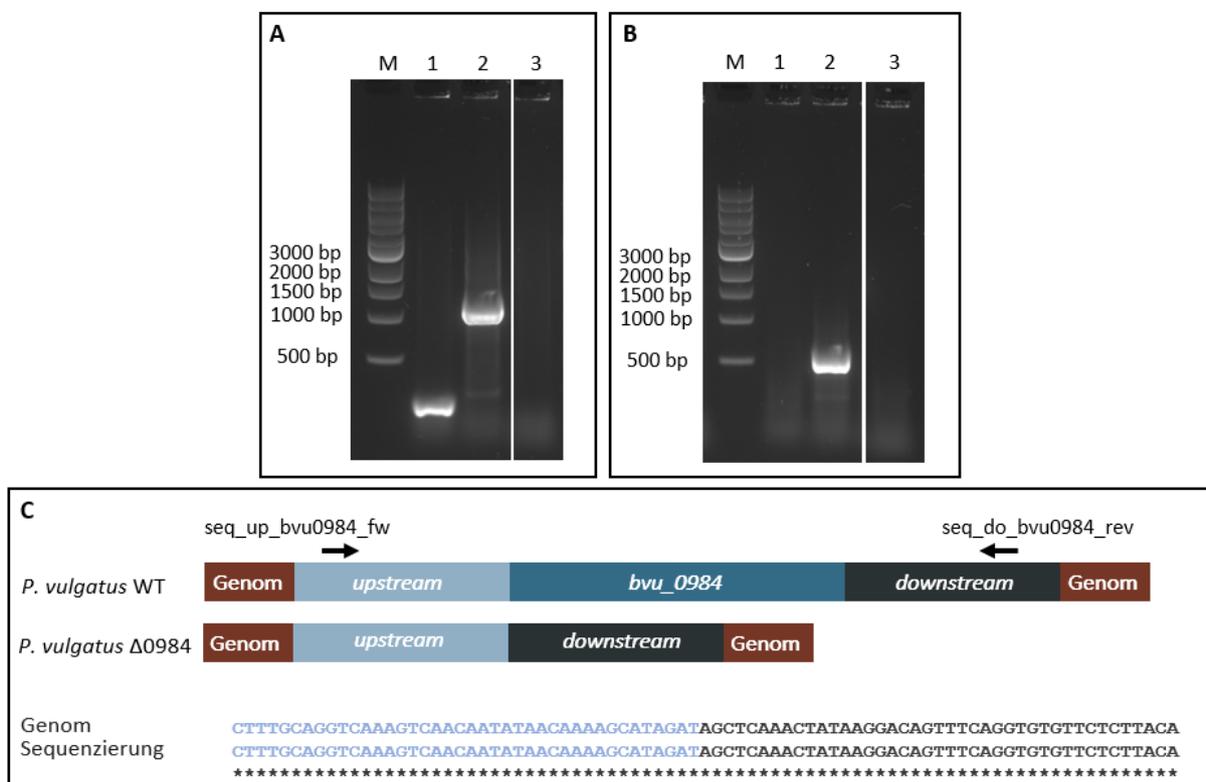


Abbildung 37: Kolonie-PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Deletion von *bvu_0984* (*upp*) in *P. vulgatus*. (A)-(B) Agarosegel zum Nachweis von *bvu_0984* (Spur 1) und *sacB* (Spur 3) in (A) *P. vulgatus* Wildtyp und (B) Kolonien nach der zweiten homologen Rekombination. Spur 2 repräsentiert den flankierenden Genombereich von *bvu_0984*, amplifiziert durch die Primer *seq_up_bvu0984_fw* und *seq_do_bvu0984_rev*. Für eine Unterscheidung zwischen Wildtyp/Revertante und Deletionsmutante wurden Fragmente mit einer Größe von 1343 bp bzw. 680 bp erwartet. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (C) Sequenzierung des flankierenden Bereichs zur Bestätigung der markerlosen Deletion des Gens *bvu_0984* in der genomischen DNA von *P. vulgatus*.

Für den phänotypischen Nachweis der Deletionsmutante wurde das Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp in Anwesenheit von 5-FU in Minimalmedium mit Glucose als Substrat (20 mM) untersucht. *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* Δ 0984 erreichten ohne die Zugabe von 5-FU eine maximale OD₆₀₀ von 0,9 (Abb. 38). Mit einer Verdopplungszeit von $2,1 \pm 0,4$ h (*P. vulgatus* Wildtyp) und

2,4 ± 0,5 h (*P. vulgatus* Δ0984) war das Wachstumsverhalten beider Stämme vergleichbar. Die Deletion von *bvu_0984* hatte folglich keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* Δ0984. Das Enzym UPRTase, welches von *upp* kodiert wird, wandelt das Uracil-Analogen 5-FU in 5-F-UMP um. Dies wirkt sich toxisch auf den Organismus aus, da schlussendlich die Thymidylat-Synthase gehemmt und somit die DNA-Replikation- und Reparatur unterbunden wird. Somit weisen nur Organismen eine Resistenz gegenüber 5-FU auf, welche kein *upp* Gen im Genom kodieren. Wie zu erwarten, konnte durch die Supplementierung mit 12-60 µg/ml 5-FU beim *P. vulgatus* Wildtyp kein Wachstum nachgewiesen werden (Abb. 38 A). Allerdings zeigte sich, dass auch bei *P. vulgatus* Δ0984 die Zugabe von 5-FU letal für den Organismus war (Abb. 38 B).

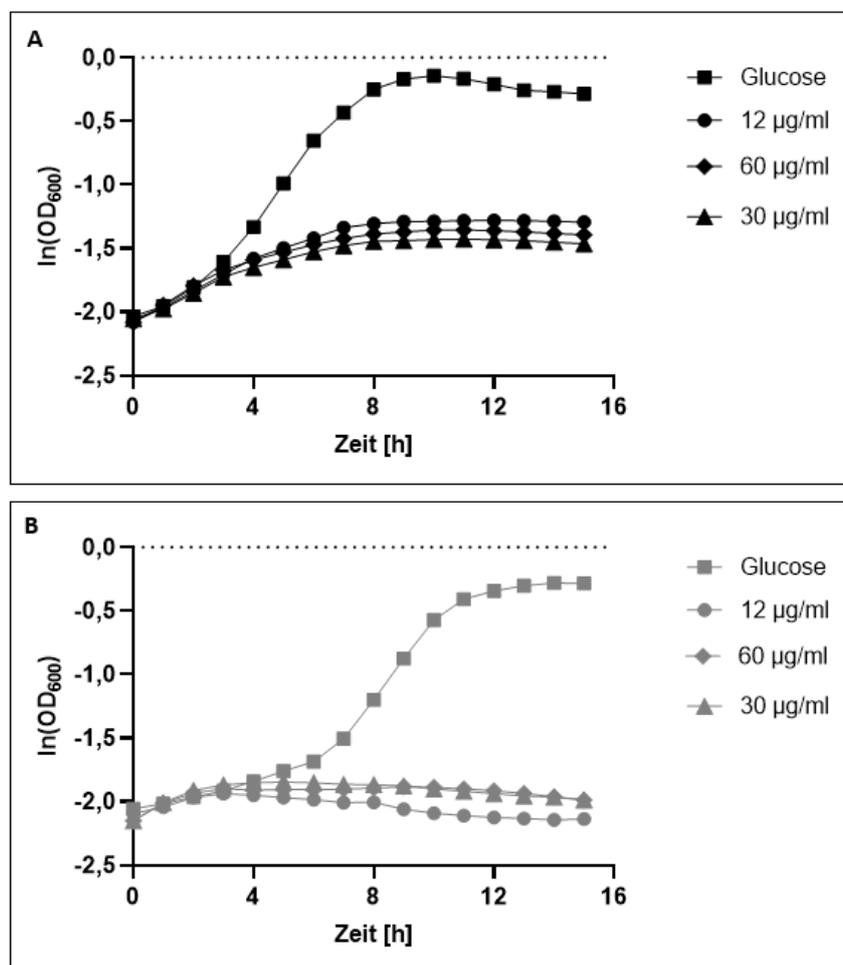


Abbildung 38: Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* Δ0984 in DMMG-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU. Dargestellt ist das Wachstum von (A) *P. vulgatus* Wildtyp und (B) *P. vulgatus* Δ0984 in DMMG-Medium und 12-60 µg/ml 5-FU. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMG-Medium wurde 1 % [v/v] mit Vorkultur beimpft.

Unter Betrachtung des Stoffwechselwegs zur Umwandlung von Uracil in UMP wurde deutlich, dass neben der UPRTase (*BVU_0984*) ein weiteres Enzym diese Reaktion ermöglicht. In *P. vulgatus*

katalysiert eine Purin-Nukleosid-Phosphorylase (BVU_3649) die Reaktion von Uracil zu Uridin, welches anschließend durch eine Uridin-Kinase (BVU_1442, BVU_2358) unter ATP-Verbrauch in UMP umgewandelt wird (Abb. 39). Somit wurde trotz der Deletion von *bvu_0984* das Uracil-Analogon 5-FU durch BVU_3649 in 5-Uridin und anschließend in das toxische Intermediat 5-UMP umgewandelt. Im Folgenden dieser Arbeit stand daher die zusätzliche Deletion von *bvu_3649* in *P. vulgatus* Δ 0984 im Fokus, um die Anwendung eines weiteren Selektionsmarker-Systems etablieren zu können.

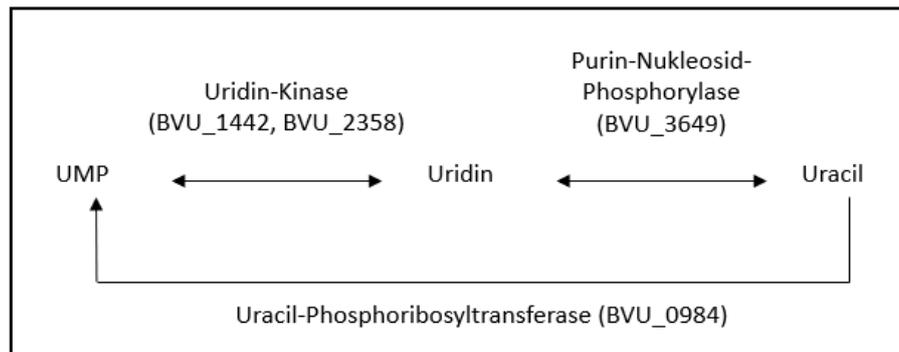


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Stoffwechsels zur Umwandlung von Uracil in UMP. Durch eine Uracil-Phosphoribosyltransferase (BVU_0984) kann Uracil direkt zu UMP umgewandelt werden. Ebenso kann Uracil in einer zweistufigen Reaktion zunächst durch eine Purin-Nukleosid-Phosphorylase (BVU_3649) zu Uridin und anschließend durch eine Uridin-Kinase (BVU_1442, BVU_2358) zu UMP verstoffwechselt werden.

Die Generierung des Deletionvektors pMM656_SacB_Δ3649 erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 3.7.). Für die Vervielfältigung der 1000 bp *up*- und *downstream*-Region wurden die Oligonukleotide *as_656SacB_up_bvu3649_for* und *as_656SacB_up_bvu3649_rev* (*upstream*-Sequenz), sowie *as_656SacB_do_bvu3649_for* und *as_656SacB_do_bvu3649_rev* (*downstream*-Sequenz) eingesetzt (Tab. 7). Die Aufnahme und Integration des Vektors durch homologe Rekombination der entsprechenden *up*- oder *downstream*-Region wurde durch den Nachweis von *sacB* im Genom der untersuchten Kolonien bestätigt (Abb. 40 B, Spur 1). Beim Ausgangsstamm (*P. vulgatus* Δ 0984), als auch bei den untersuchten Kolonien, konnte belegt werden, dass *bvu_0984* abwesend war (Abb. 40 A-B, Spur 4) und *bvu_3649* im jeweiligen Genom kodiert wurde (Abb. 40 A-B, Spur 3).

Nach Durchführung der zweiten homologen Rekombination wurden die gewachsenen Kolonien hinsichtlich des zu deletierenden Gens *bvu_3649* untersucht. Unter Einsatz der Primer qPCR_bvu3649_for und qPCR_bvu3649_rev (Tab. 7) wurde bei einer Deletion kein Fragment erwartet, wohingegen im Falle des Wildtyps eine Fragmentgröße von 200 bp vorhergesagt war. Die Analyse ergab, dass innerhalb der untersuchten Kolonien eine Deletionsmutante vorlag, da im Vergleich zum Ausgangsstamm das Gen *bvu_3649* nicht mehr vorlag (Abb. 40 A und C, Spur 3). Eine Sequenzierung

des entsprechenden Genombereichs bestätigte anschließend die markerlose Deletion von *bvu_3649* (Abb. 40 D).

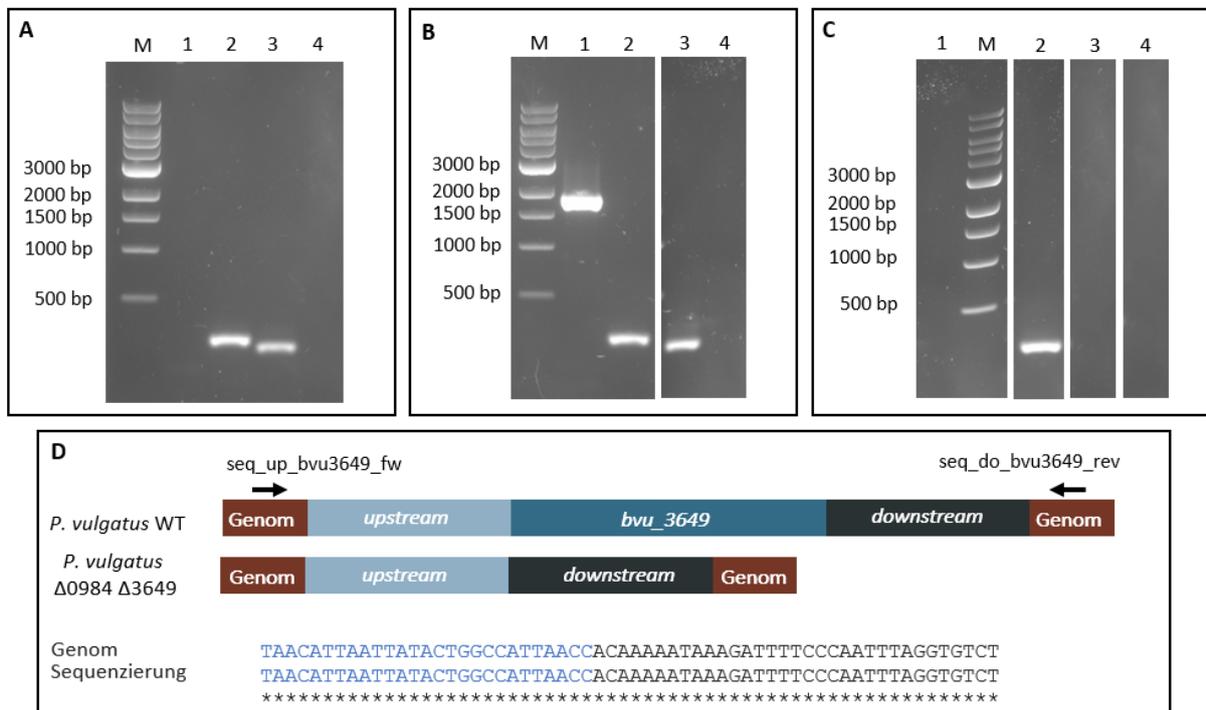


Abbildung 40: Kolonie-PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Deletion von *bvu_3649* in *P. vulgatus* Δ0984. Agarosegel zum Nachweis von *sacB* (Spur 1), 16S rRNA genspezifischer Bereich von *P. vulgatus* (Spur 2), *bvu_3649* (Spur 3) und *bvu_0984* (Spur 4) in (A) *P. vulgatus* Δ0984 und (B) Kolonien der ersten und (C) zweiten homologen Rekombination. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (D) Sequenzierung des flankierenden Bereichs zur Bestätigung der markerlosen Deletion des Gens *bvu_3649* in der genomischen DNA von *P. vulgatus* Δ0984.

Anschließend wurde das Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* Δ0984 Δ3649 auf Minimalmedium mit Glucose (20 mM) und verschiedenen Konzentrationen von 5-FU untersucht. Als Kontrolle wurde *P. vulgatus* Wildtyp ebenfalls unter gegebenen Bedingungen kultiviert. Unter Ausschluss von 5-FU erreichten beide Stämme eine OD₆₀₀ von 0,9. Ebenso zeigte sich, dass auch die Doppeldeletion von *bvu_0984* und *bvu_3649* in *P. vulgatus* keinen limitierenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Organismus hatte (Abb. 41 A). Beide Stämme wiesen Verdopplungszeit von 2,4 h ± 0,2 (*P. vulgatus* Wildtyp) und 2,3 ± 0,5 h (*P. vulgatus* Δ0984 Δ3649) auf. Durch die zusätzliche Deletion des Purin-Nukleosid-Phosphorylase kodierenden Gens *bvu_3649* hatte die Zugabe von 5-FU keinen toxischen Effekt auf *P. vulgatus* Δ0984 Δ3649. Unabhängig von der Konzentration (12-60 µg/ml 5-FU) erreichten alle Kulturen von *P. vulgatus* Δ0984 Δ3649 vergleichbare optische Dichten (Abb. 41 B). Im Gegensatz dazu war die Zugabe von 5-FU für den *P. vulgatus* Wildtyp letal. Auffällig war, dass hierbei dennoch die Konzentration eine Rolle zu spielen schien. Bei einer geringen Konzentration von 12 µg/ml 5-FU

erreichte *P. vulgatus* eine höhere optische Dichte im Vergleich zu Konzentrationen von 30 µg/ml und 60 µg/ml 5-FU im Medium (Abb. 41 B).

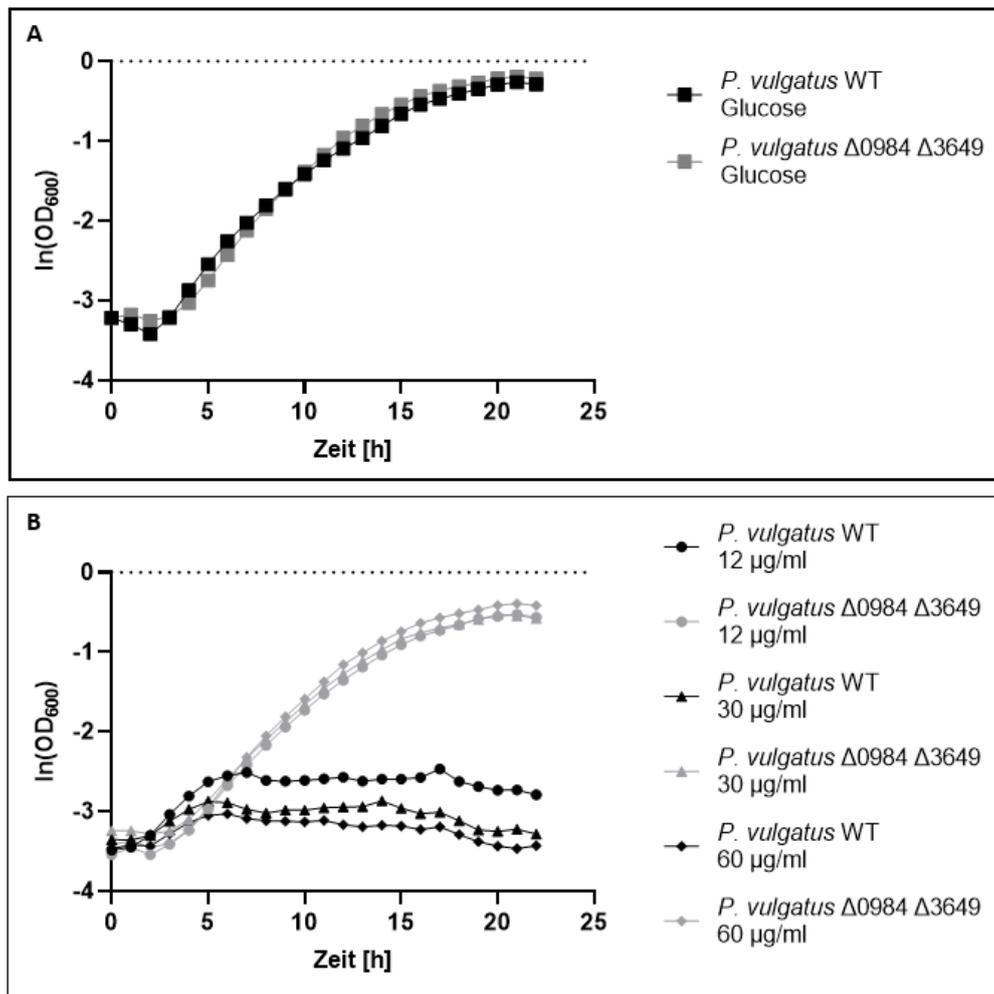


Abbildung 41: Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 0984 \Delta 3649$ in DMMG-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU. (A) Wachstumskontrolle beider Stämme mit Glucose (20 mM) als Substrat und ohne die Supplementation von 5-FU. (B) Wachstum beider Stämme auf DMMG mit 12-60 µg/ml 5-FU. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMG-Medium wurde 1 % [v/v] mit Vorkultur beimpft.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Deletion von mehr als einem Gen in *P. vulgatus* möglich ist. Durch die Deletion von *bvu_0984* und *bvu_3649* wirkte sich die Zugabe von 5-FU nicht mehr toxisch auf den Organismus aus. Durch das Fehlen der Enzyme UPRTase und Purin-Nukleosid-Phosphorylase wurde 5-FU nicht weiter verstoffwechselt, sodass keine Inhibierung der Thymidylat-Synthase erfolgte. Grundsätzlich findet die *de-novo* Synthese von UMP nicht ausgehend von Uracil statt, sondern von Glutamin und Carbamoylphosphat (siehe Kapitel 4.5.). Aus diesem Grund hatte die Deletion von *bvu_0984* und *bvu_3649* keinen letalen Effekt auf *P. vulgatus*, sodass der Organismus gegenüber UMP nicht auxotroph war. Schlussendlich wurde durch die Deletion von *bvu_0984* und *bvu_3649* die Nutzung eines weiteren Deletionssystems in *P. vulgatus* $\Delta 0984 \Delta 3649$

ermöglicht. Auf Grundlage des Gegenselektionsmarkers *upp* konnte bereits das Gen *bvu_1663*, welches für eine Levanase in *P. vulgatus* kodiert, deletiert werden (Neff *et al.*, 2023).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde dennoch *sacB* als Gegenselektionsmarker verwendet. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Gegenselektion mit *sacB* auf Komplexmedium, unter dem Zusatz von lediglich Saccharose, durchgeführt werden kann. Dennoch kann das in dieser Arbeit entwickelte Deletionssystem auf der Grundlage des Gens *upp* in *Bacteroidales*-Stämmen genutzt werden, bei denen die Anwendung von *sacB* als Gegenselektionsmarker nicht möglich ist (siehe Kapitel 4.5).

3.7.2. Ausschaltung des Propionat-Stoffwechsels in *P. vulgatus*

Für die Generierung eines optimierten Produktionsstamms, welcher eine biotechnologisch effiziente Succinat-Ausbeute gewährleistet, wäre Succinat als einziges Stoffwechselprodukt wünschenswert. Neben Succinat produziert *P. vulgatus* die Stoffwechselprodukte Acetat, Lactat, Formiat und Propionat. Propionat wird in mehreren Schritten durch die Decarboxylierung von Succinat gebildet. Damit Succinat nicht weiter verstoffwechselt wird und somit der reduktive Teil des zentralen Kohlenstoffmetabolismus ausschließlich mit der Bildung von Succinat enden würde, stand zunächst die Unterbindung des Synthesewegs von Propionat in *P. vulgatus* im Vordergrund. Dafür wäre die Deletion des ersten Gens im Propionat-Stoffwechsel, der Succinat-CoA-Transferase (BVU_1163), offensichtlich gewesen. Durch die Deletion der Succinat-CoA-Transferase würde Succinat nicht zu Succinyl-CoA umgewandelt werden, sodass ausschließlich Succinat im Medium akkumulieren würde. Unter Betrachtung der Funktionalität von BVU_1163 wird jedoch deutlich, dass dieses Enzym ebenfalls die Reaktion von Succinyl-CoA zu Succinat im nicht-geschlossenen Citratzyklus von *P. vulgatus* katalysiert (siehe Kapitel 4.6.1.) und somit essenziell für diesen Stoffwechselweg ist. Aus diesem Grund war eine Deletion von *bvu_1163* ausgeschlossen.

Das nach der CoA-Transferase im Propionat-Stoffwechsel folgende Enzym Methylmalonyl-CoA-Mutase (MM-CoA-Mutase) wird von den Genen *bvu_0309* und *bvu_0310* kodiert. Hierbei stellt BVU_0309 die kleine und BVU_0310 die große Untereinheit des Enzyms dar. Beide Gene werden chromosomal von einem Operon kodiert, was die direkte Deletion beider Gene ermöglichte. Für die Erstellung des Deletionsvektors wurden der *up*- und *downstream*-Bereich des Operons unter Verwendung der Oligonukleotide *as_656SacB_up_bvu0309_for* und *as_656SacB_up_bvu0309_rev* (*upstream*-Sequenz), sowie *as_656SacB_do_bvu0310_for* und *as_656SacB_do_bvu0310_rev* (*downstream*-Sequenz) generiert (Tab. 7). Die erste homologe Rekombination des assemblierten Konstrukts pMM656_SacB_Δ0309-10 in das Genom von *P. vulgatus* wurde durch den Nachweis von *sacB* (Abb. 42

B, Spur 2) und dem für *P. vulgatus* 16S rRNA genspezifischen Bereich (Abb. 42 B, Spur 1) verifiziert. Wie im Wildtyp konnten auch die Gene *bvu_0309-10* in den untersuchten Kolonien detektiert werden (Abb. 42 A-B, Spur 3-4). Die Durchführung der zweiten homologen Rekombination mit anschließender Selektion auf PY-Agarplatten mit Saccharose führte zum Verlust des Plasmidrückgrats und damit auch des Gegenselektionsmarker *sacB* (Abb. 42 C, Spur 2). Ebenso konnten die zu deletierenden Gene *bvu_0309* und *bvu_0310* nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 42 C, Spur 3-4), was die Generierung einer Deletionsmutante verifiziert. Zum Nachweis von *P. vulgatus* wurde der spezifische Bereich der 16S rRNA des Organismus detektiert (Abb. 42 C, Spur 1). Durch die Verwendung der Primer *seq_up_bvu0309-10_for* und *seq_do_bvu0309-10_for* (Tab. 7) erfolgte die Sequenzierung des flankierenden Genombereichs (Abb. 42 D). Dadurch konnte die markerlose Deletion des Operons *bvu_0309-10* auch auf Sequenzebene bestätigt werden.

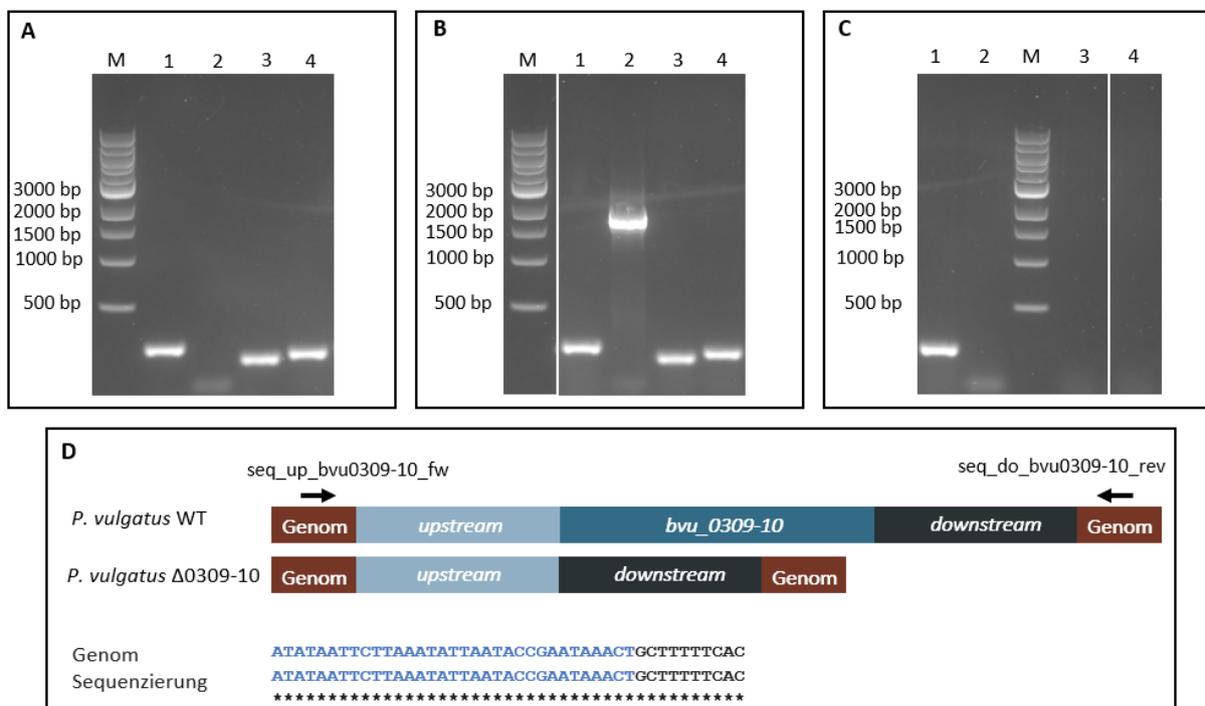


Abbildung 42: Kolonie-PCR und Sequenzierung der Deletion von *bvu_0309-10* in *P. vulgatus*. (A)-(C) Agarosegel zum Nachweis des 16S rRNA genspezifischen Bereichs von *P. vulgatus* (Spur 1), *sacB* (Spur 2), sowie der kodierenden Gene für die MM-CoA-Mutase *bvu_0309* (Spur 3) und *bvu_0310* (Spur 4) in (A) *P. vulgatus* Wildtyp, (B) Kolonien der ersten und (C) zweiten homologen Rekombination. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (D) Ergebnis der Sequenzierung des flankierenden Bereichs zur Bestätigung der markerlosen Deletion des Operons *bvu_0309-10* in der genomischen DNA von *P. vulgatus*.

Anschließend wurde untersucht, ob die Deletion der MM-CoA-Mutase und somit die Unterbindung des Propionat-Stoffwechsels das Wachstumsverhalten der Deletionsmutante *P. vulgatus* Δ0309-10 beeinflusste. Bei der Kultivierung auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat (20 mM) betrug die Verdopplungszeit der Deletionsmutante $0,97 \pm 0,1$ h und war mit der des Wildtyps ($0,92 \pm 0,08$ h)

vergleichbar. Beide Stämme erreichten eine maximale OD_{600} von 1 (Abb. 43 A). Somit schien die Deletion der Gene *bvu_0309-10* des Propionat-Stoffwechsels in *P. vulgatus* keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Organismus zu haben.

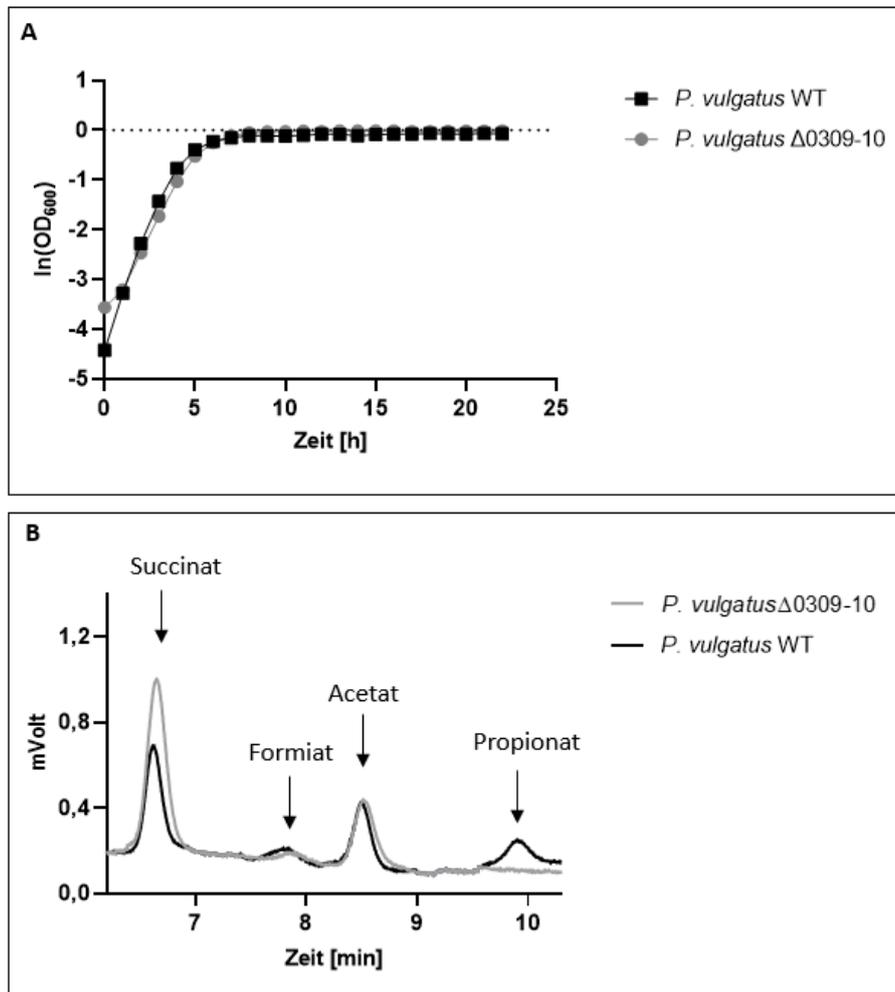


Abbildung 43: Wachstumsverhalten und Produktbildung von *P. vulgatus* Wildtyp und der Deletionsmutante $\Delta bvu_0309-10$ während des Wachstums auf DMMX-Medium. (A) Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMX-Medium wurde 1 % [v/v] aus einer Vorkultur beimpft. **(B)** HPLC-Chromatogramm der Stoffwechselendprodukte im Kulturüberstand beider Stämme. Die OD_{600} betrug bei beiden Kulturen OD 1.

Neben dem Wachstumsverhalten wurden auch die Stoffwechselendprodukte beider Stämme nach Kultivierung in Minimalmedium mit Xylose als Substrat (20 mM) mittels HPLC analysiert. In Abb. 43 ist beispielhaft ein Elutionsprofil der Kulturüberstände von Wildtyp und Mutante bei einer OD_{600} von 1 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass Propionat als finales Produkt des reduktiven Zweigs des zentralen Kohlenstoffmetabolismus nicht mehr nachzuweisen war (Abb. 43 B). Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Deletion der Gene *bvu_0309* und *bvu_0310* die Unterbindung des Propionat-Stoffwechsel in *P. vulgatus* zur Folge hatte.

Durch die Auswertung von 20 weiteren Kulturen von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ konnte bei der Deletionsmutante eine Steigerung der Succinat-Ausbeute um 95 % belegt werden (Abb. 44 C; 45 A). Mit $7,6 \pm 0,68$ mmol Succinat /g TG bildete *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ im Verhältnis beinahe doppelt so viel Succinat wie der Wildtyp-Stamm von *P. vulgatus* ($3,9 \pm 0,78$ mmol Succinat/g TG) (Abb. 44 A). Bei Wachstum auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat (20 mM) verbrauchte der *P. vulgatus* Wildtyp $24 \pm 4,4$ mmol Xylose/g TG und die Deletionsmutante 22 ± 5 mmol Xylose/g TG. Dies entsprach einem Ertrag von 0,13 g Succinat pro g Xylose (Wildtyp) und 0,25 g Succinat pro g Xylose (Mutante). Acetat wurde von beiden Stämmen in der gleichen Größenordnung produziert, 10 mmol/g TG durch den Wildtyp-Stamm und 9,5 mmol/g TG durch *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$. Lactat und Formiat, als Stoffwechselendprodukte des fermentativen Teils des zentralen Kohlenstoffwechsels, wurden von beiden Stämmen mit Xylose als Substrat kaum gebildet (Abb. 44 A).

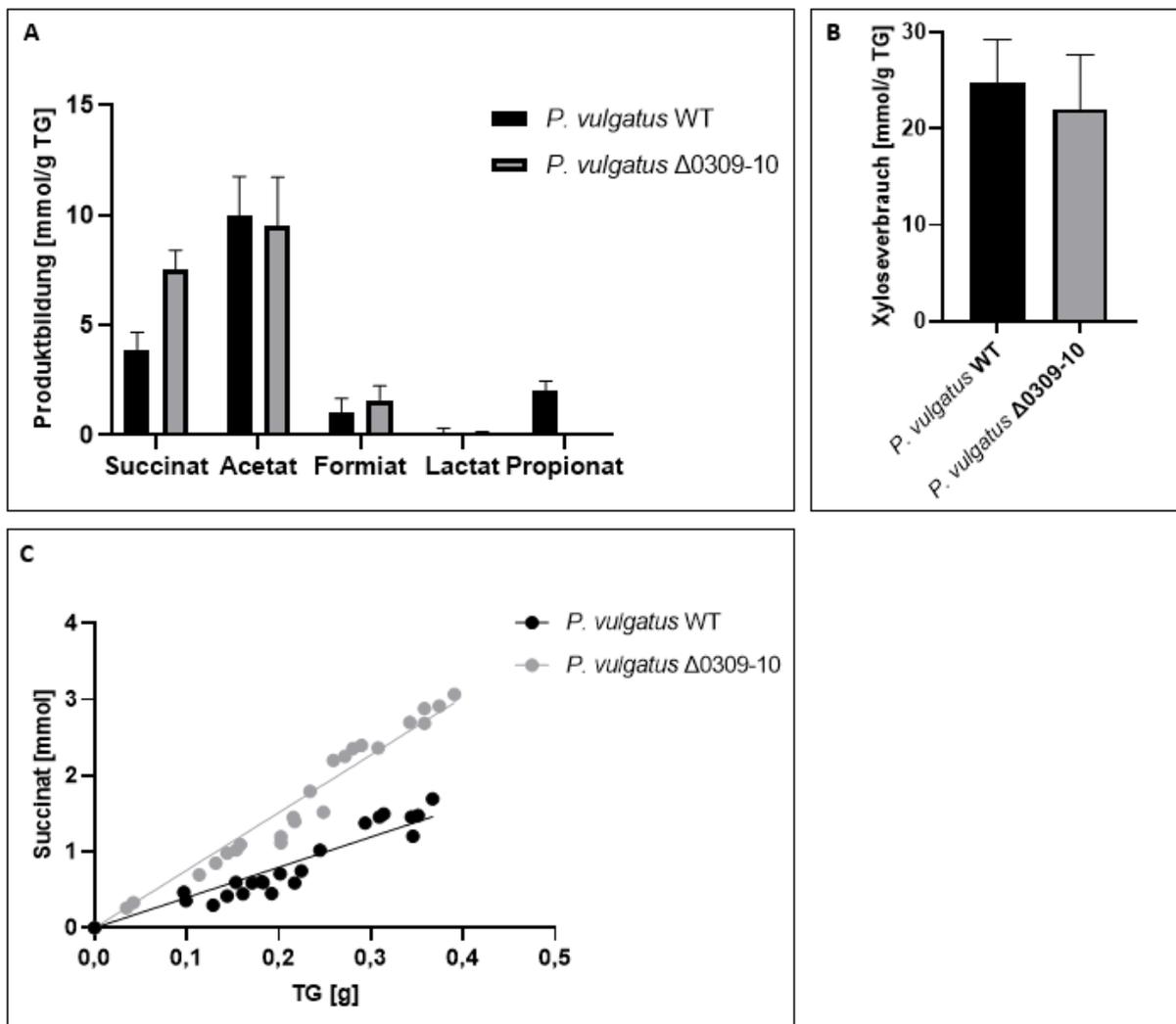


Abbildung 44: Produktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* Wildtyp und der Deletionsmutante $\Delta bv u_0309-10$, während des Wachstums auf DMMX-Medium. 16 Kulturen von jedem Stamm wurden in der exponentiellen Phase geerntet und deren Überstand mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der

Stoffwechselendprodukte und des Substratverbrauchs wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. (A) Stoffwechselendprodukte und (B) Substratverbrauch während des Wachstums auf DMMX-Medium. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. (C) Succinat-Konzentration der einzelnen Kulturen bei Wachstums auf DMMX-Medium.

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Summe der produzierten Menge von Succinat und Propionat des Wildtyps der Konzentration an Succinat entsprächen, welche durch *P. vulgatus* Δ 0309-10 gebildet werden würde. Da der *P. vulgatus* Wildtyp $3,9 \pm 0,78$ mmol/g TG Succinat und $2,2 \pm 0,4$ mmol Propionat/g TG bildete, entspräche dies einer Konzentration von 6 mmol/g TG.

Interessanterweise bildete die Deletionsmutante mit 7,6 mmol/g TG Succinat 23 % mehr Succinat als der Wildtypstamm Succinat und Propionat zusammen (Abb. 45 B).

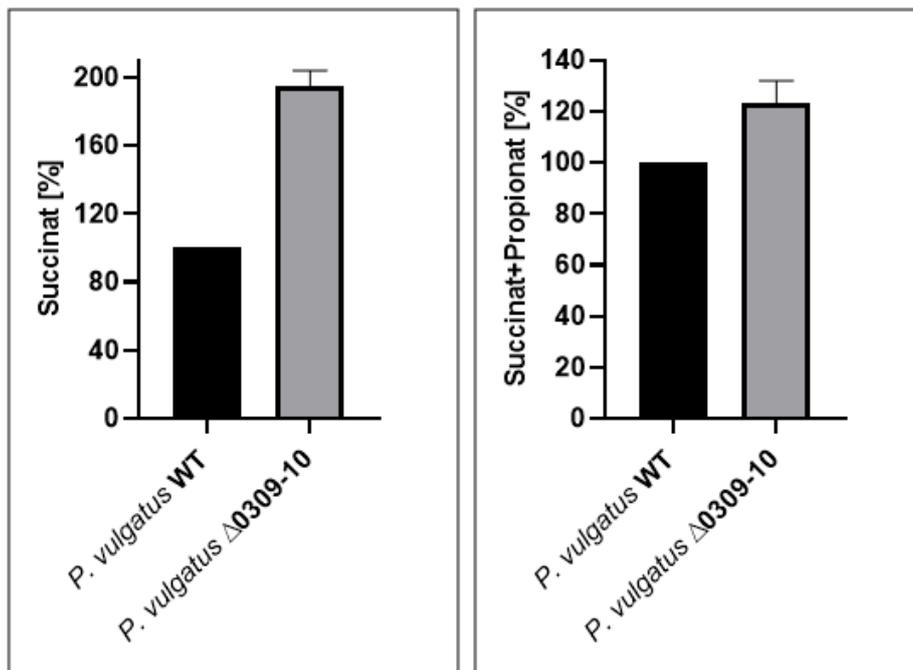


Abbildung 45: Produktanteil von Succinat und Propionat von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* Δ 0309-10. (A) Anteil der Stoffwechselprodukte von Succinat und (B) Succinat + Propionat während des Wachstums auf DMMX-Medium, in Bezug auf die gebildete Menge des Wildtyps. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Im Folgenden dieser Arbeit wurde überprüft, ob durch eine Komplementierung des Operons *bvu_0309-10* der Propionat-Stoffwechsel in *P. vulgatus* Δ 0309-10 wiederhergestellt wird und somit Propionat als Stoffwechselendprodukt wieder vom Organismus gebildet werden kann. Um die natürlichen Bedingungen bestmöglich widerzuspiegeln, wurde die Genomsequenz von *bvu_0309-10* mit 285 bp der stromaufwärts gelegenen nativen Promotorsequenz des Operons (*bvu_0309-10nP*) in den genomintegrativen Vektor pMM656 kloniert. Als *suicide*-Vektor integriert pMM656 über die Plasmid-kodierte *attN2-site* in das Genom des Organismus, sodass *bvu_0309-10nP* nur einmal im Organismus kodiert vorliegen würde. Durch Verwendung der Primer *as_656_bvu_0309-10nP_for* und

as_656_bvu_0309-10nP_rev (Tab. 7) wurde der zu klonierende Sequenzbereich aus dem Genom von *P. vulgatus* vervielfältigt. Die Amplifizierung des Plasmidrückgrats erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotide bb_pMM656_for und bb_pMM656_rev (Tab. 7). Als Template hierfür diente das Ursprungsplasmid pMM656, bei welchen durch die Wahl der Primer die Sequenz pRhakIPAO-*nanoluc* ersetzt wurde. Mittels Hitzeschock wurde das Konstrukt pMM656_bvu0309-10nP (Abb. 46 B) in *E. coli* β 2155 transferiert, vervielfältigt und anschließend durch Elektroporation in den Organismus *P. vulgatus* eingebracht. Durch anschließende Kolonie-PCR konnte die Integration des Plasmidrückgrats über die homologe *attN2-site* auf dem Plasmid und einer der beiden *attN-sites* in das Genom des Organismus nachgewiesen werden. Durch Verwendung der Oligonukleotide screen_pMM656_for und screen_pMM656_rev (Tab. 7) und anschließender Gelelektrophorese wurde die zu erwartende Fragmentgröße von 4559 bp aufgetrennt (Abb. 46 A). Der generierte Stamm wird im Folgenden als *P. vulgatus* Δ 0309-10::bvu_0309-10nP bezeichnet.

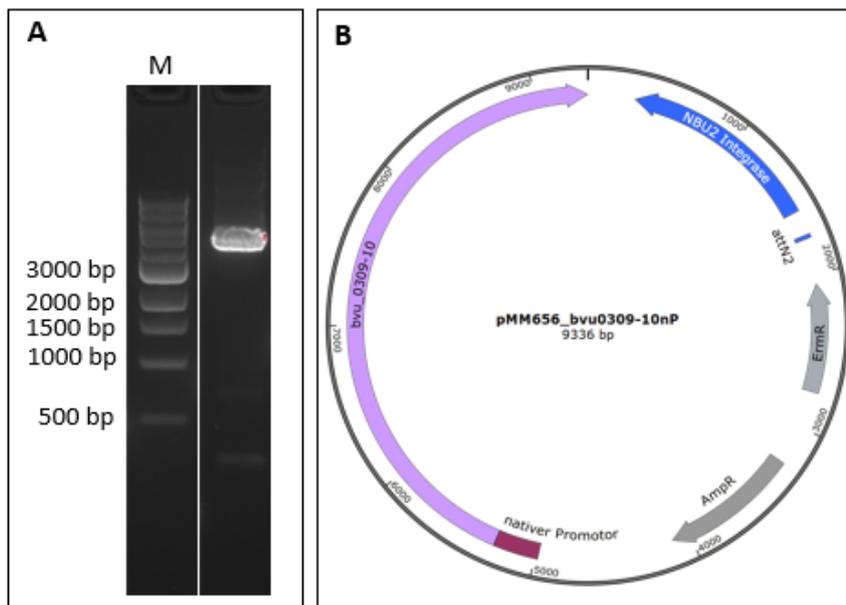


Abbildung 46: Kolonie-PCR zum Nachweis von pMM656_bvu0309-10nP in *P. vulgatus* Δ 0309-10. (A) Dargestellt ist das PCR-Produkt des flankierenden Bereichs der klonierten Sequenz von *bvu_0309-10* mit nativer Promotorsequenz in pMM656. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (B) Plasmidkarte von pMM656_bvu0309-10nP. Das Plasmid kodiert *bvu_0309-10* inklusive 200 bp der stromaufwärts-Sequenz zur Initiation der Transkription. AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette; ErmR = Erythromycin-Resistenzkassette; R6KoriV = *origin of replication*; RP4OriT = *origin of transfer*.

Durch eine anschließende HPLC-Analyse konnten $0,84 \pm 0,09$ mmol/g TG Propionat im Kulturüberstand von *P. vulgatus* Δ 0309-10::bvu_0309-10nP gemessen werden (Abb. 47 A). Obwohl die Propionat Menge durch die komplementierte Mutante im Vergleich zu der des Wildtyps (2,2 mmol Propionat/g TG) reduziert war, konnte dennoch bestätigt werden, dass die Plasmid-vermittelte Expression von *bvu_0309-10nP* zur Wiederherstellung des Synthesewegs von Propionat führte.

Außerdem schien die Plasmid-basierte Produktion der MM-CoA-Mutase auch eine Auswirkung auf die Produktion von Succinat zu haben. Somit konnte bei der komplementierten Mutante eine Ausbeute von $7,8 \pm 0,8$ mmol Succinat/g TG bestimmt werden, was trotz der zusätzlich gebildeten Propionat-Menge mit der Succinat-Ausbeute der entsprechenden Deletionsmutante ($7,6 \pm 0,7$ mmol/g TG) vergleichbar war (Abb. 47 B). Unter dem Gesichtspunkt der gemeinsamen Betrachtung von Succinat und Propionat als Stoffwechselendprodukte führte somit die Komplementierung von *bvu_0309-10* zu einer Steigerung der Succinat + Propionat-Ausbeute im Vergleich zum *P. vulgatus* Wildtyp (Abb. 47 C).

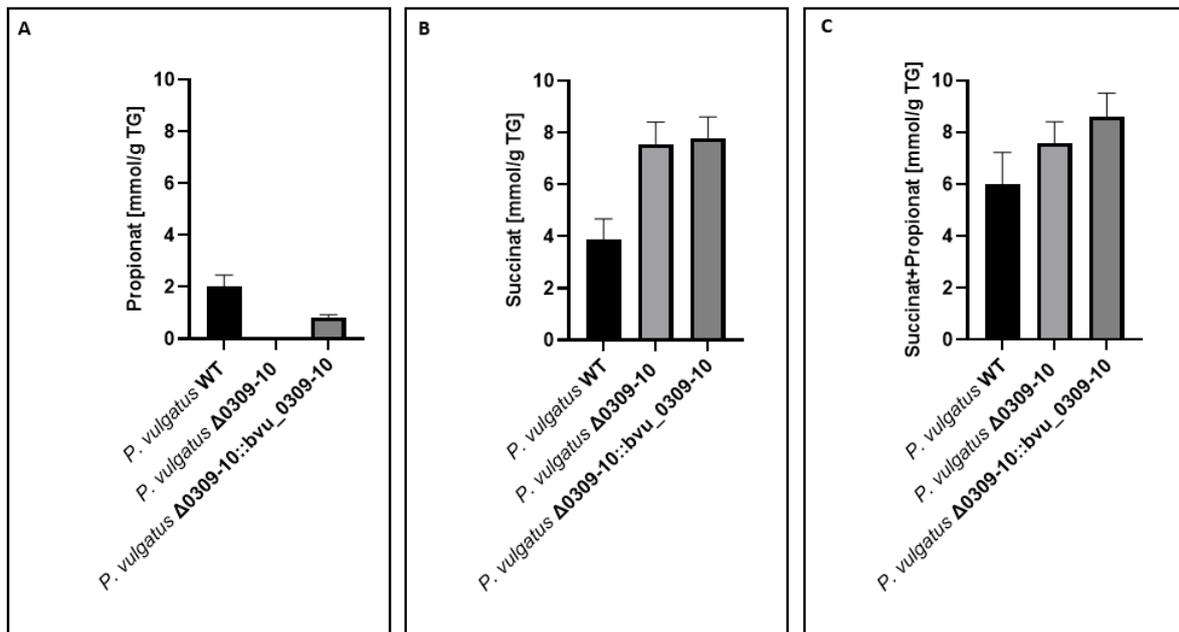


Abbildung 47: Produktbildung von Succinat und Propionat von *P. vulgatus* Wildtyp, *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ und *P. vulgatus* $\Delta 0309-10::bvu_0309-10$ nP. (A) Bildung von Propionat und (B) Succinat während des Wachstums auf DMMX-Medium. (C) Die Summe der gebildeten Mengen von Succinat und Propionat. Die Konzentrationen der entsprechenden Stoffwechselendprodukte wurden mit dem Trockengewicht der jeweiligen Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Zusammengefasst führte die Deletion der Gene *bvu_0309* und *bvu_0310* in *P. vulgatus* zu einer Unterbindung des Synthesewegs von Propionat. Durch das Fehlen des Enzyms MM-CoA-Mutase wurde Succinat nicht weiter zu Propionat verstoffwechselt, was eine Akkumulation von Succinat im Medium der Deletionsmutante zur Folge hatte. Im Vergleich zum Wildtyp konnte dadurch die Ausbeute von Succinat um 95 % gesteigert werden. Eine Komplementierung des entsprechenden Operons durch eine angepasste Form des Expressionsvektors pMM656 führte zur Wiederherstellung der Propionat-Bildung im Organismus.

3.7.3. Deletion der D-Lactat-Dehydrogenase (BVU_2449) in *P. vulgatus* Δ 0309-10

Durch die Unterbindung des Propionat-Stoffwechselwegs konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von Genen, welche für zentrale Enzyme des Kohlenstoffmetabolismus kodieren, in *P. vulgatus* möglich ist. Somit wurde im Folgenden dieser Arbeit der Fokus auf Gene gelegt, dessen Deletion den Kohlenstofffluss in Richtung Succinat lenken könnte oder den Verbrauch von [H] minimieren würde. Ein potentielles Gen stellte *bvu_2499* dar. Dieses Gen kodiert für eine D-Lactat-Dehydrogenase in *P. vulgatus*, welches die Reduktion von Pyruvat in Lactat, gekoppelt mit der Oxidation von NADH zu NAD⁺, katalysiert. Somit werden für die Bildung von Lactat [H] in Form von NADH verbraucht. Durch die Deletion des entsprechenden Gens würden folglich mehr [H] für die Bildung von Succinat zur Verfügung stehen.

Für die Konstruktion des Deletionsvektors wurden die 1000 bp des *up*- und *downstream*-Bereichs von *bvu_2499* unter Verwendung der Oligonukleotide *as_656SacB_up_bvu2449_for* und *as_656SacB_up_bvu2449_rev* (*upstream*-Bereich) bzw. *as_656SacB_dwon_bvu2449_for* und *as_656SacB_down_bvu2449_rev* (*downstream*-Bereich) generiert (Tab. 7). Es folgte die Assemblierung beider Fragmente mit dem Plasmidrückgrat wie zuvor unter Abschnitt 3.7.1. beschrieben. Nach Durchführung der biparentalen Konjugation zum Transfer des Deletionskonstrukts pMM656_SacB_Δ2449 in *P. vulgatus* Δ0309-10 wurden die auf selektiven Agarplatten gewachsenen Kolonien in eine Kolonie-PCR eingesetzt. Durch ein 200 bp großes Fragment konnte die für *P. vulgatus* spezifische 16S rRNA nachgewiesen werden (Abb. 48 B, Spur 1). Da als Ausgangsstamm *P. vulgatus* Δ0309-10 verwendet wurde, konnte sowohl in diesem, als auch in den untersuchten Kolonien, kein Fragment für die kodierenden Gene der MM-CoA-Mutase (*bvu_0309-10*) detektiert werden (Abb. 48 A-B, Spur 3-4). Unter Verwendung der Oligonukleotide *qPCR_bvu2499_for* und *qPCR_bvu2499_rev* (Tab. 7) hingegen wurde in beiden Stämmen ein für *bvu_2499* korrespondierendes Fragment von 200 bp vervielfältigt (Abb. 48 A-B, Spur 5). Durch den Nachweis des auf dem Deletionsvektor kodierten Gegenselektionsmarkers *sacB* in den untersuchten Kolonien, konnte die Integration des Plasmidrückgrats durch homologe Rekombination des *up*- oder *downstream*-Bereichs von *bvu_2499* bestätigt werden (Abb. 48 B, Spur 2). Nach Durchführung der zweiten homologen Rekombination wurde kein entsprechendes Fragment von 2000 bp unter Verwendung der Primer *screen_pMM656_sab_for* und *screen_pMM656_sab_rev* (Tab. 7) amplifiziert, was den Verlust des Plasmidrückgrats bekräftigte (Abb. 48 C, Spur 2). Eine Deletion von *bvu_2499* konnte durch das Fehlen des entsprechenden Gens (Abb. 48 C, Spur 5) nachgewiesen und durch anschließende Sequenzierung des Genombereichs unter Verwendung der Oligonukleotide *seq_up_bvu2449_for* und *seq_do_bvu2449_rev* bestätigt werden (Abb. 48 D).

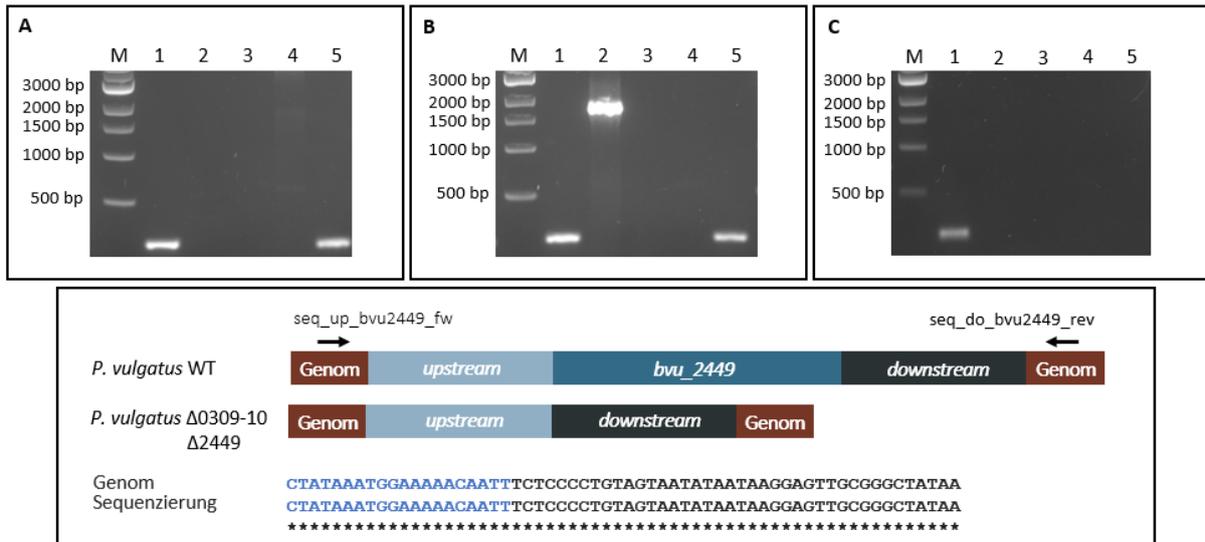


Abbildung 48: Kolonie-PCR und Sequenzierung der Deletion von *bv_u_2449* in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$. (A)-(C) Agarosegel zum Nachweis des 16S rRNA genspezifischen Bereichs von *P. vulgatus* (Spur 1), *sacB* (Spur 2), sowie der kodierenden Gene für die MM-CoA-Mutase *bv_u_0309* (Spur 3) und *bv_u_0310* (Spur 4) und der D-LDH *bv_u_2449* (4) in (A) *P. vulgatus* Wildtyp, (B) Kolonien der ersten und (C) zweiten homologen Rekombination. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (D) Sequenzierung des flankierenden Bereichs zur Bestätigung der markerlosen Deletion des Gens *bv_u_2449* in der genomischen DNA von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$.

Die Kultivierung von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2449$ auf DMMX-Medium zeigte, dass die Deletion zweier Enzyme des zentralen Kohlenstoffmetabolismus (MM-CoA-Mutase und D-LDH) keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Organismus hatte. Beide Stämme erreichten eine maximale OD_{600} von 1 und auch die Verdopplungszeit der Doppeldeletionsmutante ($0,88 \pm 0,02$ h) war mit der des Wildtyps ($0,83 \pm 0,05$ h) vergleichbar (Abb. 49).

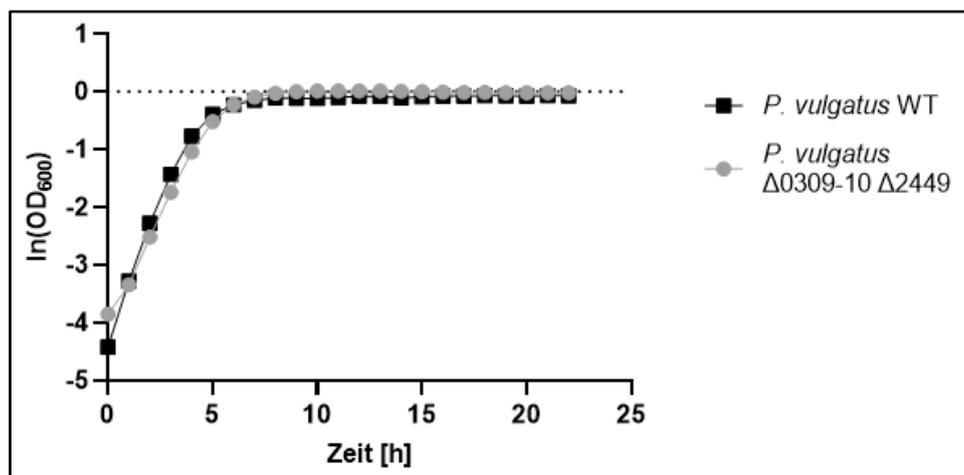


Abbildung 49: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2449$ in DMMX-Medium. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMX-Medium wurde 1 % [v/v] aus einer Vorkultur inokuliert.

Eine anschließende Analyse der Stoffwechselendprodukte mittels HPLC lieferte den Nachweis, dass kein Lactat mehr durch die Doppelmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ gebildet wurde (Abb. 50 A). Somit wurde durch das Fehlen der D-Lactat-Dehydrogenase Pyruvat nicht mehr zu Lactat reduziert und infolgedessen keine [H] in Form von NADH verbraucht. Wie zu erwarten, wurde im Kulturüberstand von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ mittels HPLC auch kein Propionat gemessen. Die Konzentration des gebildeten Succinats durch *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ betrug $8 \pm 0,8$ mmol /g TG (Abb. 50 A).

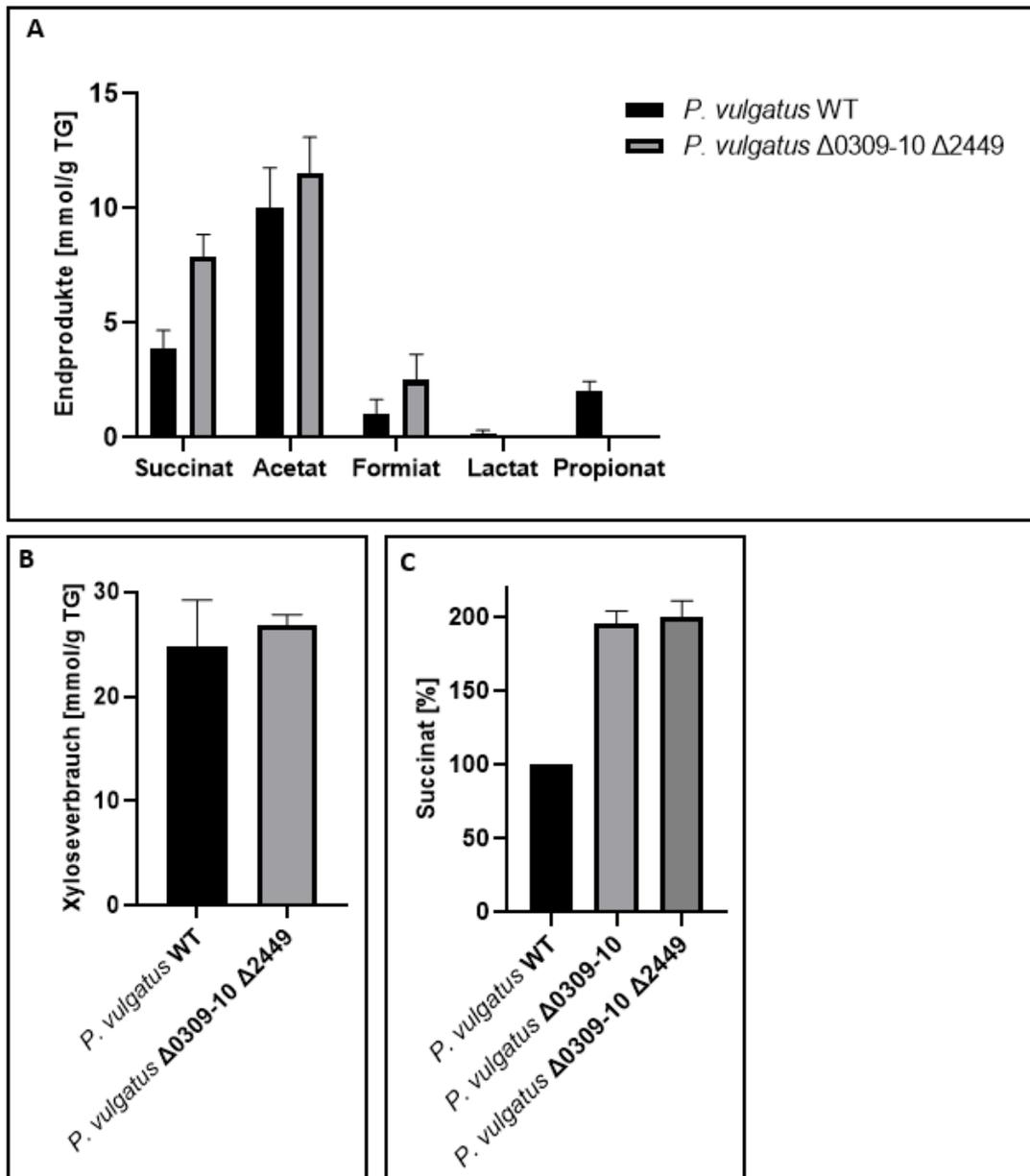


Abbildung 50: Produktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$, während des Wachstums auf DMMX-Medium. 16 Kulturen von jedem Stamm wurden in der exponentiellen Phase geerntet und deren Überstand mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte und des Substratverbrauchs wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. (A) Stoffwechselendprodukte und (B) Substratverbrauch während des Wachstums auf DMMX-Medium. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. (C) Anteil von Succinat [%] bei

Wachstums auf DMMX-Medium der Deletionsmutanten von $\Delta 0309-10$ bzw. $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ in Bezug auf den Wildtyp.

Im Vergleich zu *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ führte somit die zusätzliche Deletion der D-LDH lediglich zu einem Anstieg der Succinat-Ausbeute um 5 %. Im Vergleich zum Wildtyp entsprach dies jedoch einer Steigerung um 100 % (Abb. 50 C). Der Xyloseverbrauch der Doppeldeletionsmutante betrug 27 ± 1 mmol/g TG und war somit geringfügig erhöht im Vergleich zum Substratverbrauch des Wildtyp-Stamms ($25 \pm 4,4$ mmol/g TG) (Abb. 50 B). Unter Einbezug des Xyloseverbrauchs der einzelnen Stämme konnte der Ertrag an Succinat in g pro g Xylose berechnet werden, wodurch sich für die Doppeldeletionsmutante ein Ertrag von 0,24 g Succinat pro g Xylose ergab. Dieser Ertrag deckte sich mit dem Ertrag von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$, bei welcher nur die MM-CoA-Mutase deletiert wurde. Im Hinblick auf die gebildete Acetat-Menge war diese in der Doppeldeletionsmutante (11,5 mmol/g TG) im Vergleich zum Wildtyp (10 mmol/g TG) leicht erhöht. Ebenso auffällig war die gesteigerte Formiat-Bildung durch *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ mit 2,5 mmol Formiat/g TG. Im Vergleich zum Wildtyp entsprach dies einem Verhältnis von 1:2,5 (Abb. 50 A). Die Deletion des D-LDH kodierenden Gens *bvu_2499* führte zur Unterbindung der Bildung von Lactat als Stoffwechselendprodukt des zentralen Stoffwechsels von *P. vulgatus*. Folglich wurden für die Reduktion von Pyruvat zu Lactat keine [H] in Form von NADH mehr benötigt, welche schließlich der Bildung von Succinat zur Verfügung stehen sollten. Auch wenn der Ertrag gebildeten Succinats der Doppeldeletionsmutante im Vergleich zu *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ dadurch nicht signifikant gesteigert werden konnte, ist die Deletion dieses Stoffwechselabschnitts ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Generierung eines Homosuccinat Produzenten.

3.7.4. Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase (BVU_2880) in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$

Eine weitere Strategie, die Ausbeute an Succinat weiter zu optimieren, war die Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) aus *P. vulgatus*. Die PFL katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat. Durch die Deletion des für die PFL kodierenden Gens *bvu_2880* war kein negativer Einfluss auf den Organismus zu erwarten, da für die Bildung von Acetat notwendiges Acetyl-CoA weiterhin durch die Umsetzung von Pyruvat durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase bereitgestellt werden würde. Eine detaillierte Ausführung dieses Reaktionswegs ist in Kapitel 4.6.2. beschrieben.

Mit dem Ziel der Deletion von *bvu_2880* wurde für die Konstruktion des Deletionsvektors unter Verwendung der Oligonukleotide *as_656SacB_up_bvu2880_for/as_656SacB_up_bvu2880_rev* und *as_656SacB_do_bvu2880_for/as_656SacB_do_bvu2880_rev* (Tab. 7) der entsprechende *up-* bzw. *downstream-*Bereich vervielfältigt und mit dem Plasmidrückgrat von pMM656_SacB assembliert.

Um zu überprüfen, welchen Effekt die Deletion der PFL auf den Zentralmetabolismus von *P. vulgatus* hat, wurde der Deletionsvektor pMM656_SacB_Δ2880 zunächst in den Wildtypstamm von *P. vulgatus* mittels biparentaler Konjugation überführt. Durch eine Kolonie-PCR wurden die auf den selektiven Agarplatten gewachsenen Kolonien hinsichtlich des 16S rRNA genspezifischen Bereichs für *P. vulgatus* und auf das Vorhandensein des Gegenselektionsmarkers *sacB* überprüft. Für beides konnte ein Fragment mit einer Bandengröße von 200 bp bzw. 2000 bp (Abb. 51 A-B, Spur 1 und 3) detektiert werden, sodass die Integration des Plasmidrückgrats durch homologe Rekombination des *up-* oder *downstream-*Bereichs in das Genom des Organismus bestätigt wurde.

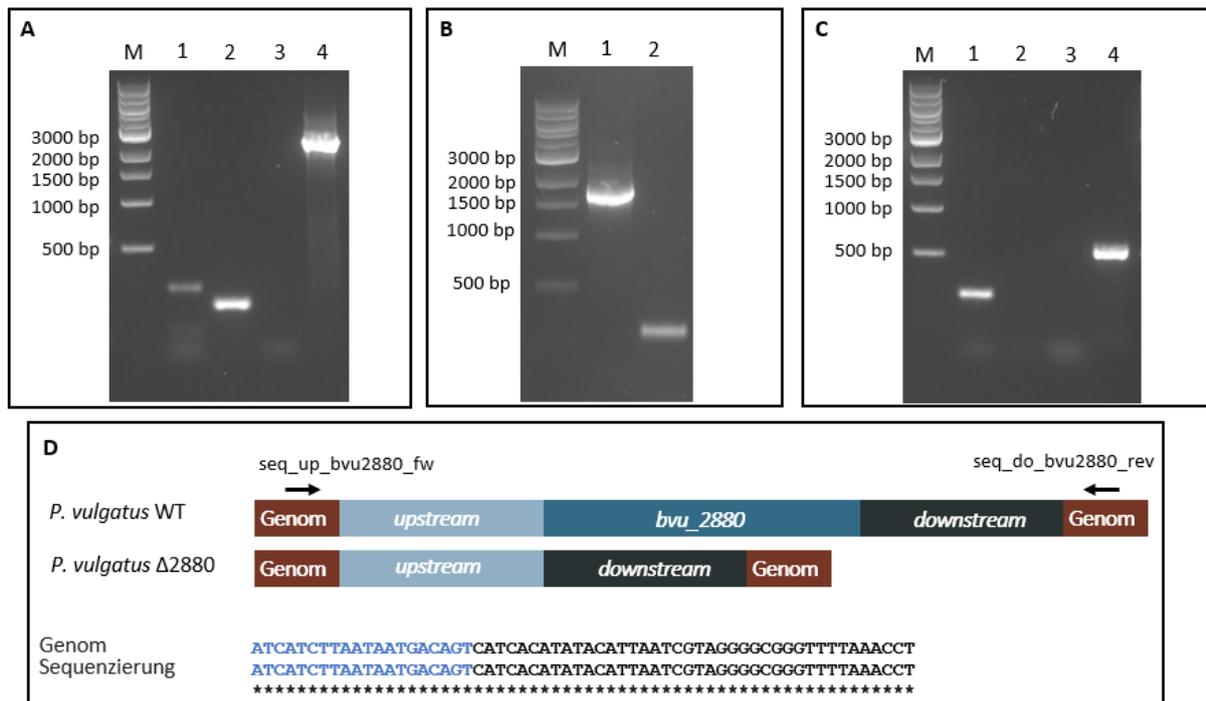


Abbildung 51: Kolonie-PCR und Sequenzierung der Deletion von *bvu_2880* in *P. vulgatus* (A) und (C) Agarosegel zum Nachweis des 16S rRNA genspezifischen Bereichs von *P. vulgatus* (Spur 1), *bvu_2880* (Spur 2), des Gegenselektionsmarkers *sacB* (Spur 3) und des flankierenden Genombereichs von *bvu_2880* (Spur 4) in (A) *P. vulgatus* Wildtyp und (C) Kolonien nach der zweiten homologen Rekombination. (B) Agarosegel zum Nachweis von *sacB* (Spur 1) des für *P. vulgatus* genspezifischen Bereichs der 16S rRNA (Spur 2) in Kolonien der ersten homologen Rekombination. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (D) Sequenzierung des flankierenden Bereichs zur Bestätigung der markerlosen Deletion des Gens *bvu_2880* in der genomischen DNA von *P. vulgatus*.

Anschließend wurden Kolonien, welche die erste homologe Rekombination durchlaufen hatten für die Durchführung der zweiten homologe Rekombination eingesetzt. Die auf Saccharose gewachsenen Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR analysiert und neben *sacB* und dem 16S rRNA genspezifischen Bereich auch hinsichtlich des zu deletierenden Gens *bvu_2880* untersucht. Da *sacB* bei den untersuchten Kolonien nicht mehr nachzuweisen war, bestätigte dies zunächst den Verlust des Plasmidrückgrats aus dem Genom des Organismus. Weiterhin konnte durch die Abwesenheit von

bvu_2880 (Abb. 51 C, Spur 2) die Deletion des entsprechenden Gens nachgewiesen werden. Durch die Verwendung der Oligonukleotide *seq_up_bvu2880_for* und *seq_up_bvu2880_rev* (Tab. 7), welche das zu deletierende Gen flankierten, wurde beim Wildtyp eine Fragmentgröße von 2800 bp nachgewiesen (Abb. 51 A, Spur 4). Bei der Deletionsmutante war die Fragmentgröße um die Größe des Gens reduziert, was in einer Fragmentgröße von etwa 500 bp resultierte (Abb. 51 C, Spur 4). Eine anschließende Sequenzierung der flankierenden Region unter Verwendung der zuvor genannten Oligonukleotide bestätigte die markerlose Deletion des für die PFL kodierenden Gens (Abb. 51 D).

Die Wachstumsanalyse auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat (20 mM) belegte, dass die Deletion von *bvu_2880* sich nicht wachstumslimitierend auf den Organismus auswirkte. Wie der Wildtyp, erreichte *P. vulgatus* $\Delta 2880$ eine maximale OD_{600} von 1. Die Verdopplungszeit der Deletionsmutante betrug $0,9 \pm 0,08$ h, die des Wildtyps $0,83 \pm 0,05$ h (Abb. 52).

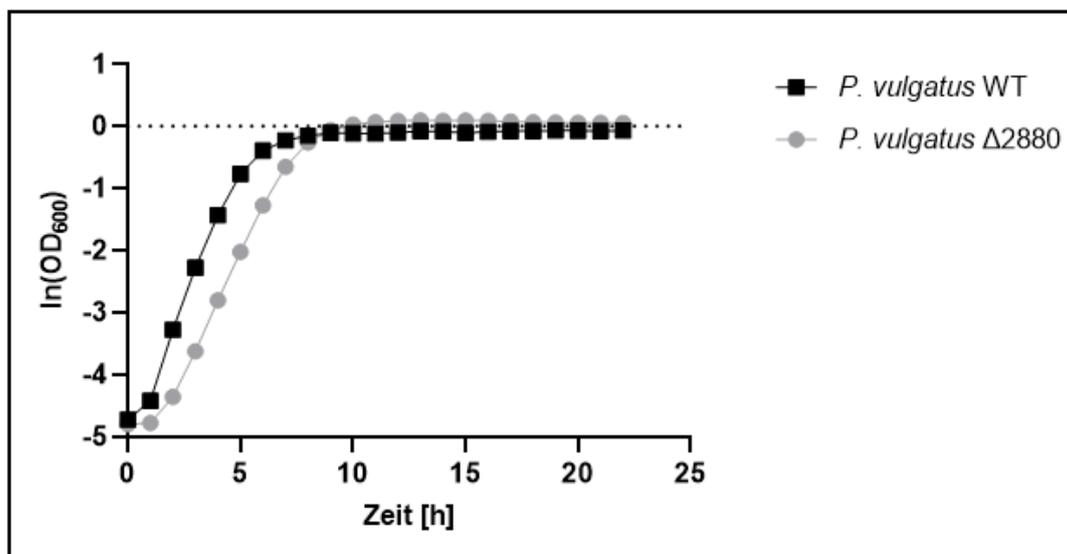


Abbildung 52: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 2880$ in DMMX-Medium. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMX-Medium wurde 1 % [v/v] aus einer Vorkultur beimpft.

Zunächst wurde die Deletion der PFL in *P. vulgatus* auf enzymatischer Ebene untersucht. Dafür wurde im Kulturüberstand von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 2880$ (beide eine OD_{600} von 1) die mögliche Umsetzung von Formiat durch eine Formiat-Dehydrogenase untersucht. Dabei wurde Formiat, katalysiert durch das Hilfsenzym Formiat-Dehydrogenase, zu CO_2 umgesetzt. Diese Reaktion ist gekoppelt mit der Reduktion von NAD^+ zu $NADH$. Für den Wildtyp konnte eine Absorptionsänderung (ΔE_{340}) von 0,2/min nachgewiesen werden, was die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase und folglich das Vorhandensein von Formiat im Kulturüberstand des Wildtyps bestätigte. Bei der Mutante, bei welcher *bvu_2880* deletiert wurde, konnte hingegen keine Umsetzung von Formiat durch die Formiat-

Dehydrogenase nachgewiesen werden (Abb. 53 A). Folglich wurde durch das Fehlen der PFL in *P. vulgatus* $\Delta 2880$ kein Formiat gebildet.

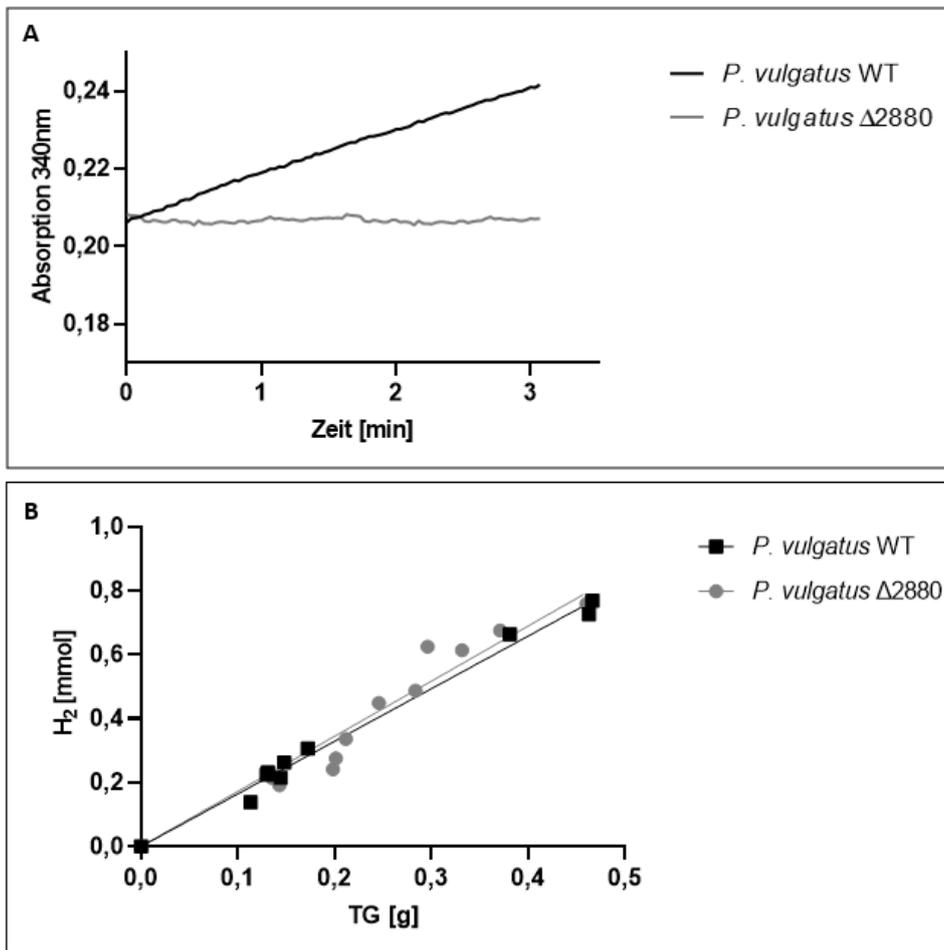


Abbildung 53: Enzymatischer Nachweis von Formiat im Kulturüberstand und Wasserstoffbildung von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 2880$. (A) Das Vorhandensein von Formiat im Kulturüberstand (OD₆₀₀ von 1) wurde durch die Aktivität des Hilfszyms Formiat-Dehydrogenase über die daran gekoppelte Reduktion von NAD⁺ zu NADH bei einer Wellenlänge von 340nm nachgewiesen. Das Assayvolumen von 1 ml beinhaltete 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7), 250 μ M NAD⁺, 100 μ l Kulturüberstand (1:10 verdünnt) und 0,5 U Formiat-Dehydrogenase. Der Versuch wurde jeweils zweimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Reaktionsverlauf dargestellt ist. (B) Wasserstoffbildung während des Wachstums auf DMMX-Medium. Die Gasphase von neun Kulturen von jedem Stamm wurde in der exponentiellen Phase entnommen und 100 μ l dessen mittels Gaschromatograph analysiert. Die gebildeten Konzentrationen an Wasserstoff wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert.

Die Deletion der PFL hatte zur Folge, dass Pyruvat nur noch über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgesetzt werden konnte, was zur Bildung von [H] in Form von Fd_{red} und zur Freisetzung von CO₂ führt. Wie bereits erwähnt, wird im Genom von *P. vulgatus* eine [FeFe]-Hydrogenase (BVU_0347) kodiert, welche Fd_{red} zur Bildung molekularen Wasserstoffs (H₂) nutzt (siehe Kapitel 1.2.1.). Daher wurde im Folgenden dieser Arbeit untersucht, ob durch eine möglicherweise vermehrte Menge an freigesetztem Fd_{red} mehr H₂ von der Deletionsmutante gebildet wurde. Es stellte

sich heraus, dass zwischen *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 2880$ kein signifikanter Unterschied in der gebildeten Menge H_2 ausgemacht werden konnte. Während der Wildtyp $1,6 \pm 0,18$ mmol H_2 /g TG bildete, wurden bei der Deletionsmutante $1,72 \pm 0,25$ mmol H_2 /g TG gemessen (Abb. 53 B).

Zur Untersuchung der Verhältnisse der Stoffwechselendprodukte wurden 19 Kulturen beider Stämme mittel HPLC analysiert. In allen Kulturen der Deletionsmutante war kein Formiat nachweisbar (Abb. 54 A). Sowohl *P. vulgatus* Wildtyp als auch die Deletionsmutante verbrauchten 24 mmol Xylose/g TG (Abb. 54 B). Acetat wurde mit einer Menge von $10 \pm 1,8$ mmol/g TG (Wildtyp) und $9,8 \pm 1,9$ mmol/g TG (Mutante) am meisten produziert. Auch die Konzentrationen an Propionat waren mit einer Konzentration von $2 \pm 0,4$ mmol Propionat/g TG für *P. vulgatus* und $2,1 \pm 0,8$ mmol Propionat/g TG für *P. vulgatus* $\Delta 2880$ vergleichbar. Im Vergleich wurde Lactat als Stoffwechselendprodukt des fermentativen Stoffwechselwegs von beiden Stämmen in geringen Mengen gebildet (Abb. 54 A).

Im Hinblick auf Succinat konnte keine Steigerung durch die Deletion der PFL erzielt werden (Abb. 54 A). Mit $3,7 \pm 1,2$ mmol/g TG war die gemessene Konzentration von Succinat so hoch wie die des Wildtyps (3,9 mmol Succinat/g TG).

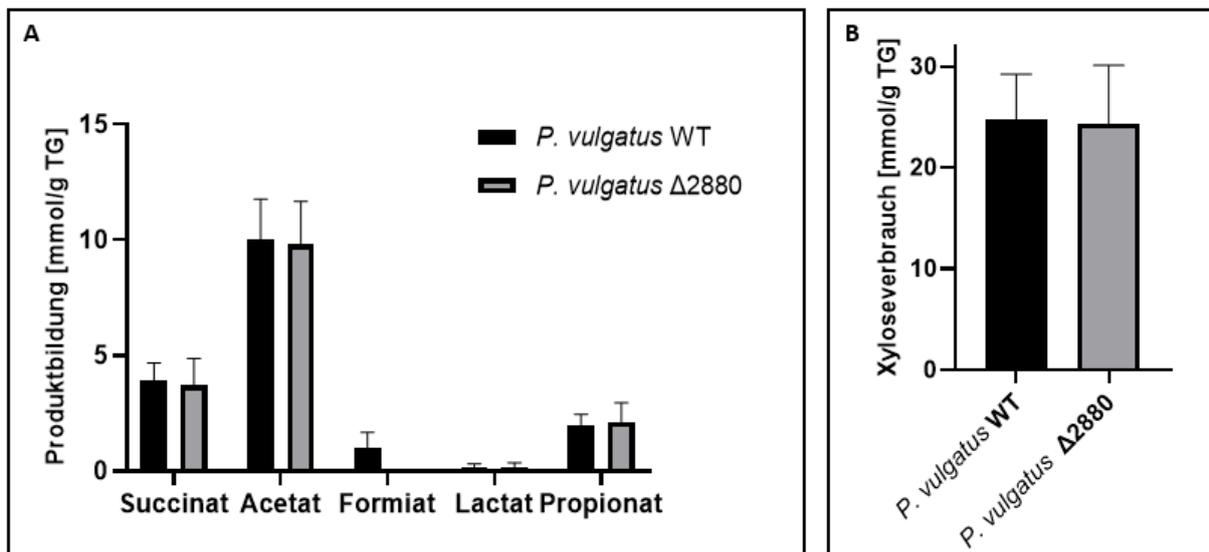


Abbildung 54: Produktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 2880$, während des Wachstums auf DMMX-Medium. 19 Kulturen von jedem Stamm wurden in der exponentiellen Phase geerntet und deren Überstand mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte und des Substratverbrauchs wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. (A) Stoffwechselendprodukte und (B) Substratverbrauch während des Wachstums auf DMMX-Medium. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Obwohl die Deletion von *bvu_2880* nicht den gewünschten Effekt einer gesteigerten Ausbeute von Succinat zur Folge hatte, ist dennoch die Unterbindung der Formiat-Bildung als konkurrierendes Nebenprodukt für die Generierung eines effizienten Succinat-Produzenten wünschenswert.

Daher sollte die PFL auch in der Doppeldeletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ deletiert werden, sodass neben Propionat und Lactat auch Formiat nicht mehr als Stoffwechselendprodukt gebildet werden würde. Für die markerlose Deletion von *bvu_2880* in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ konnte der bereits konstruierte Deletionsvektor pMM656_SacB_Δ2880 verwendet werden. Die biparentale Konjugation, sowie die zweite homologe Rekombination, wurden von der Masterstudentin Kaja Grewe (im Zuge eines Laborpraktikums) durchgeführt. Die so generierte Tripel-Mutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ wurde in dieser Arbeit im Hinblick auf die zusätzliche Deletion von *bvu_2880* überprüft und das Stoffwechselendprofil dieser Mutante analysiert.

Sowohl im Ausgangsstamm *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$, als auch in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ konnte der für *P. vulgatus* genspezifische Bereich der 16S rRNA, als auch das Fehlen der bereits deletierten Gene *bvu_0309-10* und *bvu_2449* bestätigt werden (Abb. 55 A-B, Spur 1 und 4-6). Unter Verwendung der Primer qPCR_bvu2880_for und qPCR_bvu2880_rev (Tab. 7), welche im Gen *bvu_2880* binden, wurde lediglich im Ausgangsstamm ein Fragment von 200 bp amplifiziert. Bei der untersuchten Mutante konnte hierbei kein Fragment nachgewiesen werden, was die Deletion von *bvu_2880* bestätigte. Mit Hilfe der Oligonukleotide seq_up_bvu2880_for und seq_do_bvu2880_rev (Tab. 7) wurde bei *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$ ein 2700 bp großes Fragment generiert, was der prognostizierten Größe des Gens inklusive der entsprechend flankierenden Bereiche des Gens entsprach (Abb. 55 A, Spur 3). Bei der untersuchten Mutante betrug die Fragmentgröße etwa 500 bp (Abb. 55 B, Spur 3). Da die Größe von *bvu_2880* 2229 bp beträgt, war die Fragmentgröße um die Länge des Gens reduziert und die Deletion von *bvu_2880* bewiesen.

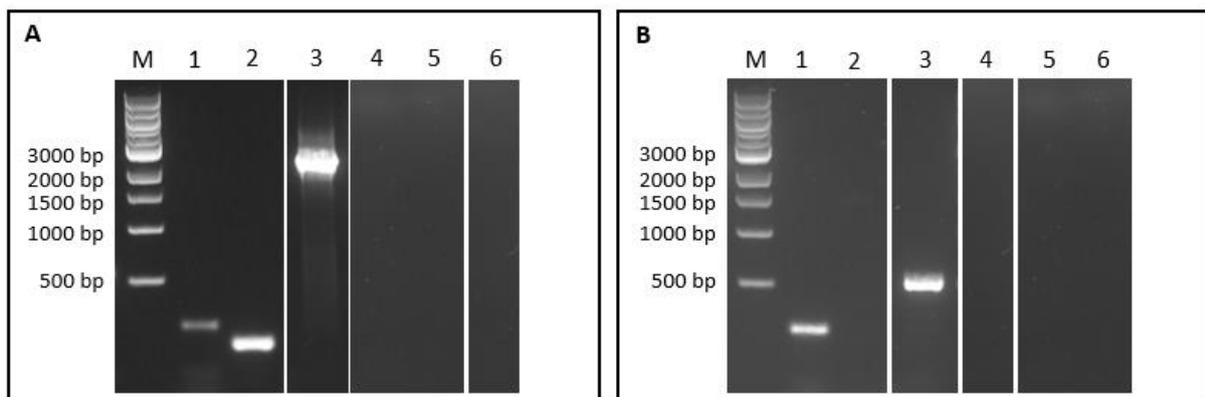


Abbildung 55: Kolonie-PCR zum Nachweis der Deletion von *bvu_2880* in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449$. Dargestellt sind Agarosegele für den Nachweis der 16S rRNA von *P. vulgatus* (Spur 1) und der Gene *bvu_2880* (Spur 2), *bvu_0309* (Spur 4), *bvu_0310* (Spur 5) und *bvu_2449*. Spur 3 repräsentiert den flankierenden Genombereich des Gens *bvu_2499*, welcher unter Verwendung der Primer seq_up_bvu2499_for und seq_do_bvu2499_rev vervielfältigt wurde. Für eine Unterscheidung zwischen Wildtyp/Revertante und Deletionsmutante wurden Fragmentgrößen von 2700 bp bzw. 500 bp erwartet. (A) *P. vulgatus* Wildtyp und (B) *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$.

Wie auch zuvor bei der Deletion der MM-CoA-Mutase und der D-LDH hatte auch die zusätzliche Deletion der PFL keinen limitierenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der dreifachen Deletionsmutante (Abb. 56). Bei der Kultivierung von *P. vulgatus* Wildtyp im Vergleich zu *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ auf DMMX-Medium erreichten beide Stämme vergleichbare Verdopplungszeiten von $0,84 \pm 0,07$ h (Wildtyp) und $0,89 \pm 0,1$ h (Mutante).

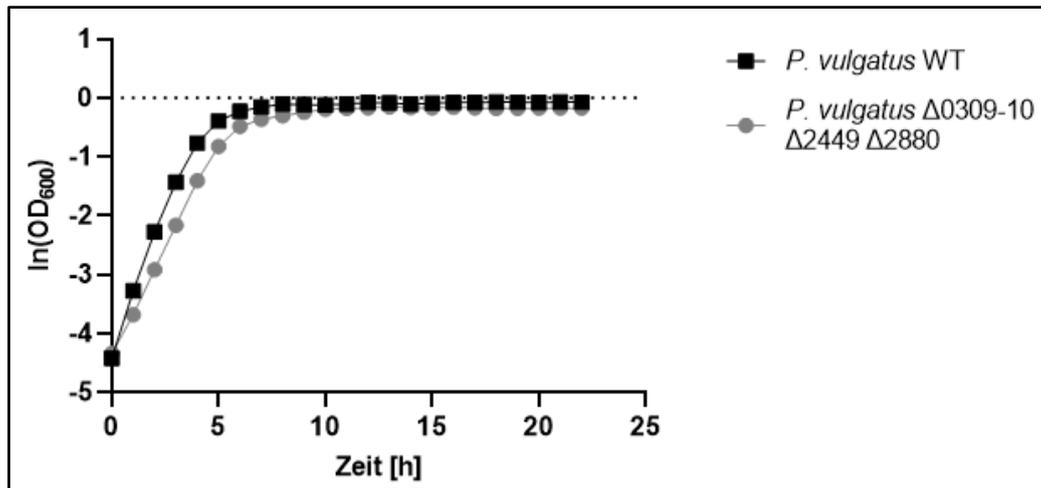


Abbildung 56: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ in DMMX-Medium. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. DMMX-Medium wurde 1 % [v/v] aus einer Vorkultur inokuliert.

Die Analyse der Kulturüberstände mittels HPLC bestätigte, dass durch die Deletion von *bvu_0309-10*, *bvu_2449* und *bvu_2880* die Endprodukte Propionat, Lactat und Formiat nicht mehr gebildet wurden. Folglich wurden nur noch Acetat und Succinat als Stoffwechselendprodukte der Xyloseverwertung produziert (Abb. 57). *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ verbrauchte $24,2 \pm 1,8$ mmol Xylose/g TG (Abb. 57 B) und bildete dabei $10,2 \pm 0,5$ mmol Acetat/g TG (Abb. 57 A), während der Wildtyp bei einem Verbrauch von $24 \pm 4,4$ mmol Xylose/g TG vergleichbar viel Acetat produzierte ($10 \pm 1,7$ mmol/g TG). In Bezug auf die gebildete Succinat-Menge konnte auch durch die zusätzliche Deletion von *bvu_2880* keine Steigerung der Succinat-Ausbeute erzielt werden. Dennoch war die final gebildete Menge an Succinat mit $7,3 \pm 0,65$ mmol/g TG im Verhältnis 1,9-mal höher als im *P. vulgatus* Wildtyp (Abb. 57 A).

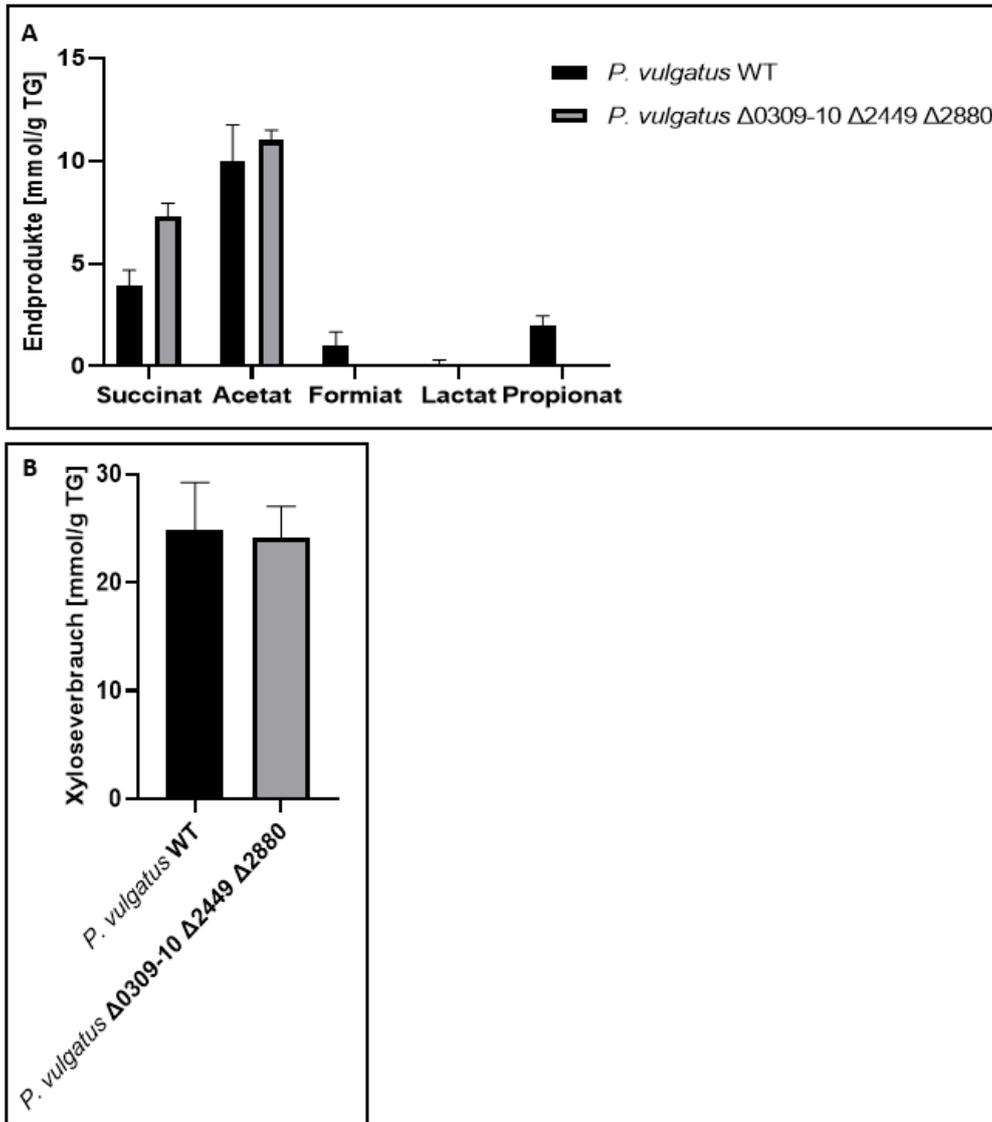


Abbildung 57: Produktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* Wildtyp und der Tripel-Mutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ während des Wachstums auf DMMX-Medium. 15 Kulturen von jedem Stamm wurden in der exponentiellen Phase geerntet und deren Überstand mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte und des Substratverbrauchs wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. (A) Stoffwechselendprodukte und (B) Substratverbrauch während des Wachstums auf DMMX-Medium. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Zusammengefasst konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Deletion mehrerer Gene des zentralen Kohlenstoffmetabolismus in *P. vulgatus* möglich ist. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion der MM-CoA-Mutase für die Etablierung eines geeigneten Succinat-Produzenten ausschlaggebend ist. Durch die Unterbindung des Synthesewegs von Propionat wurde Succinat nicht weiter zu Propionat verstoffwechselt und akkumulierte im Medium, was zu einer Verdopplung des Ertrags führte. Weitere Deletionen der D-LDH und der PFL in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ erzielten keine höhere Konzentration an Succinat. Da beide Enzyme jedoch zur Bildung konkurrierender Nebenprodukte (Lactat und Formiat) führen und somit zum Verlust von Kohlenstoff,

ist die Deletion beider Gene auf dem Weg zur Generierung eines Homosuccinat-Produzenten essenziell. Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch die homologe Expression von Genen eine Erhöhung der Succinat-Ausbeute zur Folge hatte. In zukünftigen Arbeiten könnte somit die Überexpression von Genen in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$, welcher nur Acetat und Succinat als Endprodukte des Stoffwechsels bildet, zur weiteren Optimierung eines effizienten Succinat-Produzenten beitragen (siehe Kapitel 4.7.1.).

4. Diskussion

Der menschliche Magen-Darm-Trakt stellt eine der dichtesten mikrobiellen Gemeinschaften dar, die in der Natur bekannt sind. Dieser Lebensraum wird hauptsächlich von den beiden Phyla Bacillota und Bacteroidota dominiert (Faith *et al.*, 2013; Human Microbiome Project Konsortium, 2012). Das Phylum Bacteroidota umfasst Gattungen wie *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Phocaeicola*, und *Prevotella* (Wexler und Goodman 2017). Kürzlich wurden einige Mitglieder der Gattung *Bacteroides* taxonomisch umbenannt und der Gattung *Phocaeicola* zugeordnet, innerhalb derer *P. vulgatus* einer der prominentesten Vertreter ist (García-López *et al.*, 2019). Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* besitzen Enzymsysteme für den Abbau von komplexen Polysacchariden (Hill 1995; Ley *et al.*, 2008; Flint *et al.*, 2012), die vom menschlichen Wirt nicht verstoffwechselt werden können. Die Fermentation dieser Polysaccharide führt letztlich zur Bildung kurzkettiger Fettsäuren (hauptsächlich Butyrat, Propionat und Acetat), die in das Darmlumen sekretiert und von den Kolonozyten des Wirts absorbiert werden (Fischbach und Sonnenburg 2011; Tremaroli und Bäckhed 2012; Den Besten *et al.*, 2013).

Die mikrobielle Produktion organischer Säuren aus Fermentationsprozessen gewinnt zunehmend an wirtschaftlicher Bedeutung (McKinlay *et al.*, 2007; Baumann und Westermann 2016). Da sich *Bacteroides* spp. und *Phocaeicola* spp. als hocheffektive Produzenten von Succinat, Acetat, und Propionat auszeichnen (Scheifinger und Wolin 1973; Salonen *et al.*, 2014), ist die Produktion dieser organischen Säuren durch entsprechende Organismen von großem Interesse für zukünftige biotechnologische Anwendungen. Allerdings konzentrieren sich wissenschaftliche Untersuchungen, die Ordnung *Bacteroidales* betreffend, bisher überwiegend auf die mikrobielle Zusammensetzung des Intestinaltraktes und dem Einfluss auf die menschliche Gesundheit in Bezug auf die Wechselwirkung zwischen Wirt und Mikroorganismen. Für biotechnologische Verfahren hingegen werden Bacteroidota-Spezies zur effizienten und nachhaltigen Produktion wichtiger Plattformchemikalien (wie Succinat) bisher noch nicht eingesetzt. Im Allgemeinen erfordert die Produktion von Plattformchemikalien im biotechnologischen Maßstab eine genetische Manipulation des Stoffwechsels zur Optimierung der entsprechenden biochemischen Wege. Im Hinblick auf eine biotechnologisch biobasierte und nachhaltige Succinat-Produktion durch *Bacteroidales*-Spezies, wurden im Zuge dieser Arbeit Untersuchungen zur Steigerung der Succinat-Ausbeute durch genetische Manipulation des Zentralmetabolismus von *P. vulgatus* durchgeführt.

4.1. Etablierung eines genetischen Systems in *P. vulgatus*

Die Etablierung eines genetischen Systems in *P. vulgatus* sollte eine zielgerichtete Manipulation des Stoffwechsels im Hinblick auf eine Verschiebung der Stoffwechselendprodukte hin zu einer gesteigerten Succinat-Produktion ermöglichen.

Es existieren eine Vielzahl genetischer Systeme, welche eine Modifikation biotechnologisch eingesetzter Organismen, wie *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* oder *Gluconobacter oxydans*, ermöglichen. Diese Systeme basieren unter anderem auf *shuttle*-Vektoren, genomintegrativen Expressionsvektoren und Plasmiden für eine markerlose Gendeletion (Moreau *et al.*, 1992, Smith *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003; Graf und Alenbuchner, 2011; Kostner *et al.*, 2013). Allerdings unterscheiden sich Arten des Phylums Bacteroidota hinsichtlich der Transkription und Translation von anderen Phyla, wie Proteobacteria, für welche diese Systeme vorwiegend entwickelt wurden (Smith *et al.*, 1992; Vingadassalom *et al.*, 2005). Üblicherweise nutzen Proteobakterien, wie *E. coli*, die Promotor-Konsensussequenzen -35 TTGACA und -10 TATAAT (Oliphant und Struhl, 1988). Smith *et al.* (1992) konnten zeigen, dass eine heterologe Genexpression unter Kontrolle dieser Promotorstrukturen in *B. fragilis* jedoch nicht möglich war. Spätere Studien wiesen auf, dass Vertreter der Bacteroidota die Konsensussequenzen -33 (T)TTG und -7 TAnnTTTG für die Initiation der Transkription erkennen (Bayley, 2000; Chen *et al.*, 2007; Mastropaolo *et al.*, 2009). Weiterhin unterscheiden sich die Ribosomenbindestellen (RBS) von Bacteroidota beispielsweise von der RBS von *E. coli*. So korreliert die Stärke der RBS in Bacteroidota mit einer Reihe komplexer Merkmale und nicht mit dem Vorhandensein einer klassischen Shine-Dalgarno-Sequenz (Mastropaolo, 2009; Parker und Smith, 2012; Wegmann *et al.*, 2013). Weiterhin scheint es sich bei den RBS in Bacteroidota um eine A-reiche Region zu handeln, bei denen vor allem die Positionen -3 und -6 essenziell für die Bindung des Ribosoms ist (Baez *et al.*, 2019). Diese einzigartigen Promotor- und RBS-Strukturen beeinträchtigen die Übertragung genetischer Systeme auf Spezies der Ordnung *Bacteroidales*, die für Bakterien anderer Phyla entwickelt wurden (Smith *et al.*, 1992). Weiterhin erschwerend ist die spezifische Struktur des Replikationsursprungs (*origin of vegetative replication*, oriV), welcher für die Vervielfältigung von *shuttle*- und Expressionsvektoren essenziell ist und innerhalb verschiedener Bakterien-Phyla variiert (Smith *et al.*, 1992; Vingadassalom *et al.*, 2005).

In den letzten zehn Jahren wurden einige *shuttle*-Vektoren mit konstitutiven oder induzierbaren Promotoren für eine regulierte Genexpression für Arten der Ordnung *Bacteroidales* entwickelt (Smith 1995; Hamady *et al.*, 2008; Parker und Smith, 2012; Horn *et al.*, 2016; Lim *et al.* 2017; Jones *et al.*, 2020). Darüber hinaus wurde eine Gruppe von Plasmiden identifiziert, welche eine Transposon-Mutagenese, basierend auf einem marinen Transposon, ermöglichen (Goodman *et al.*, 2009). Für die

Umsetzung einer markerlosen Deletion in *Bacteroides* spp. existieren *suicide*-Vektoren, welche in Kombination mit Erythromycin-basierter Selektion (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2009; Nakayama-Imaohji *et al.*, 2012) und antibakteriellen Gegenselektionsmarkern (García-Bayona und Comstock, 2019; Bencivenga-Barry *et al.*, 2020) eingesetzt wurden. Die meisten dieser Werkzeuge wurde allerdings für *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis* und *B. ovatus* entwickelt. Da diese Organismen der Risikogruppe 2 zugeordnet werden, ist ein biotechnologischer Einsatz ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurden für eine homologe Genexpression in *P. vulgatus* der genomintegrative Vektor pMM656 (Mimee *et al.*, 2015) und der *shuttle*-Vektor pG106 (Jones *et al.*, 2020) verwendet. Die Integration des Plasmids pMM656 wird durch die auf dem Vektorrückgrat kodierte Integrase NBU2 vermittelt, welche eine Sequenz-spezifische Rekombination zwischen der attN2-*site* auf dem Plasmid und einer der beiden attN-*sites*, welche sich am 3'-Ende der beiden für tRNA^{Ser} kodierenden Gene auf dem Chromosom befinden, katalysiert (Wang *et al.*, 2000). Dieses Plasmidsystem wurde erstmals in *B. thetaiotaomicron* angewendet, welches die tRNA^{Ser} kodierenden Gene *bt_t70* und *bt_t71* besitzt (Mimee *et al.*, 2015). Ein Sequenz-Alignment ergab, dass *P. vulgatus* ebenfalls die entsprechenden tRNA^{Ser} Gene, *bvu_2451* und *bvu_2094*, besitzt. Die Sequenzen beider Gene unterscheiden sich nur durch eine einzelne Base (Abb. 4). Allerdings weichen die stromabwärts gelegenen Regionen beider Gene voneinander ab. Dadurch konnte der Nachweis erbracht werden, dass pMM656 über das 3'-Ende des Gens *bvu_2094* in das Genom von *P. vulgatus* integriert wurde (Abb. 6).

Wang *et al.* (2000) zeigten, dass innerhalb der attN2-*site* auf dem Vektor pMM656 vor allem eine Sequenz von 13 bp für die sequenzspezifische Rekombination verantwortlich zu sein scheint (Abb. 58 A, gelb). Ebenso ist auch eine stromaufwärts gelegene Sequenz von 6 bp identisch mit der auf dem Chromosom befindlichen attN-*site* (Abb. 58, grau). Beide für die Rekombination verantwortlichen Sequenzbereiche konnten in *P. vulgatus*, aber auch in anderen Arten der Ordnung *Bacteroidales*, identifiziert werden (Abb. 58 B). Das in Abb. 58 gezeigte Alignment untermauert somit die Anwendung des Expressionsvektors pMM656 auch in weiteren Spezies der Ordnung *Bacteroidales*.

<p>A pMM656 attN2-site AAGTTCGAGAGCCTGTCTCTCCGCAAAAAACGCTGAAAATCAGCAGATTGCAAAACAAACA CCCTGTTTTACCCAAGAATGTAAAGTCGGCTGTTTTG</p>
<p>B</p> <p><i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GGAGAGGTGGCAGAGTGGTCGATTGCGGCGGTCTTGAAAACCGTTGTACTGCGAGGTACC CGGGGTTTCAATCCCTGTCTCTCCGC</p> <p><i>Phocaeicola vulgatus</i> GGAGAGGTGGCAGAGTGGTCGATTGCGGCGGTCTTGAAAACCGTTGTACTGCGAGGTACC CGGGGTTTCAATCCCTGTCTCTCCGC</p> <p><i>Phocaeicola dorei</i> GGAGAGGTGGCAGAGTGGTCGATTGCGGCGGTCTTGAAAACCGTTGTACTGCGAGGTACC CGGGGTTTCAATCCCTGTCTCTCCGC</p> <p><i>Bacteroides cellulosilyticus</i> GGAGAGGTGGCAGAGTGGTCGATTGCGGCGGTCTTGAAAACCGTTGTACTGCGAGGTACC CGGGGTTTCAATCCCTGTCTCTCCGC</p> <p><i>Bacteroides intestinalis</i> GGAGAGGTGGCAGAGTGGTCGATTGCGGCGGTCTTGAAAACCGTTGTACTGCGAGGTACC CGGGGTTTCAATCCCTGTCTCTCCGC</p> <p><i>Prevotella copri</i> GGAGAGATGGTAGAGTGGTCGATTACAACGGTCTTGAAAACCGTCTACCGAGAGGTACC GGGGGTTTCAATCCCTCTCTCTCCGC</p> <p><i>Parabacteroides johnsonii</i> GGAGAGATGGCAGAGTGGTCGATTGCGGCGGTCTTGAAAACCGTTGAACTGAGAGGTCC GGGGGTTTCAATCCCTCTCTCTCCGC</p>

Abbildung 58: Sequenz-Alignment der attN2-site auf dem Expressionsvektor pMM656 und dem Chromosom verschiedener *Bacteroidales*-Spezies. (A) Die attN2-site auf dem Plasmid pMM656 besitzt zwei Sequenzbereiche, welche mit denen der (B) attN-site am 3'-Ende der tRNA^{Ser} auf dem Chromosom der Organismen übereinstimmen. Die Rekombination findet vor allem durch eine Sequenz von 13 bp statt (gelb hinterlegt). Exemplarisch dargestellt sind die tRNA^{Ser} verschiedener Arten der Ordnung *Bacteroidales*, welche homolog zu *bt_t70* aus *B. thetaiotaomicron* sind.

Durch die Expression des *nanoluc*-Reportergens, induziert durch den Rhamnose-abhängigen Promotor pRhaKIPAO, wurde in dieser Arbeit zunächst die Funktionalität des Expressionsvektors pMM656 in *P. vulgatus* bestätigt (Abb. 7). Auch wenn die Eigenschaften des *nanoluc* Gens als Reportersystem in *P. vulgatus* unter Verwendung eines Anhydrotetracyclin-induzierbaren tet-Promotors bereits gezeigt werden konnte (Lim *et al.*, 2017), wurde in dieser Arbeit erstmals die Anwendung von pMM656 als Expressionsvektor in *P. vulgatus* aufgezeigt. Außerdem konnte bestätigt werden, dass der *shuttle*-Vektor pG106 stabil in *P. vulgatus* repliziert wird. Bis dato wurde dies nur für *Pyromonas gingivalis*, *B. thetaiotaomicron* und *B. fragilis* nachgewiesen (Jones *et al.*, 2020). In dieser Arbeit konnte somit die genetische Zugänglichkeit für Expressionsvektoren, wie pMM656 und pG106, in *P. vulgatus* erwiesen werden. Dies öffnet die Tür für eine biotechnologische Anwendung von *P. vulgatus* als Plattformorganismus für die effiziente und nachhaltige Produktion bioaktiver Verbindungen und

Bulkchemikalien durch die Verstoffwechslung erneuerbarer Ressourcen. Im Hinblick eines industriellen Einsatzes von *P. vulgatus* war jedoch ein genetisches System wünschenswert, welches eine zielgerichtete Modellierung des intrazellulären Kohlenstoffflusses ermöglichen sollte, um das Verhältnis der Stoffwechselprodukte beeinflussen zu können. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen einer homologen Expression von Genen in *P. vulgatus* werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2. Homologe Expression von *bvu_2499* in *P. vulgatus*

Die Stoffwechselprodukte des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* sind Succinat, Propionat, Acetat, Formiat und Lactat. Lactat wird durch die Reduktion von Pyruvat im reduktiven Ast des Stoffwechsels durch die Aktivität einer D-LDH (BVU_2499) gebildet. Da Lactat als metabolisches Endprodukt nicht weiter verstoffwechselt wird, war durch eine Überproduktion der D-LDH kein limitierender Einfluss auf den Organismus zu erwarten. Somit wurde die homologe Expression des *ldh* Gens (*bvu_2499*) gewählt, um neben der genetischen Zugänglichkeit von *P. vulgatus* auch eine mögliche biotechnologische Anwendung des Organismus durch die Überexpression von Genen zu testen. Anhand bioinformatischer Sequenzanalysen wurde zunächst bestätigt, dass *bvu_2499* für eine D-LDH in *P. vulgatus* kodiert. Im Gegensatz zu L-LDH (EC 1.1.1.27), sind D-LDHs vor allem in Invertebraten und Mikroorganismen nachzuweisen (Gravie, 1980), wohingegen L-LDHs in Vertebraten und höheren Pflanzen verbreitet sind (Holbrook *et al.*, 1975, Gravie, 1980). Durch enzymatische Analysen mit aufgereinigter D-LDH konnte auch die katalytische Aktivität anhand der Reduktion von Pyruvat zu Lactat, gekoppelt mit der Oxidation von NADH zu NAD⁺, bestätigt werden. Dabei entsprachen die ermittelten Werte für V_{\max} ($95,6 \pm 3$ U/mg Protein) und K_M ($1,4 \pm 0,1$ mM) den in der Literatur beschriebenen Werten (Kochhar *et al.*, 1992; Stoll *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 2014).

Stoffwechselwege in denen Lactat durch die Reduktion von Pyruvat gebildet wird sind gut verstanden. Wie jedoch Lactat zu Pyruvat von Bakterien umgewandelt wird ist weitestgehend ungeklärt. *E. coli* beispielsweise kodiert eine L-Lactat Oxidase (*lldD*), wodurch dem Organismus ermöglicht wird mit L-Lactat als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen (Dong *et al.*, 1993). Allerdings sind Gene wie *lldD* in anderen Organismen nicht konserviert. Im Gegensatz dazu ist das in der Literatur beschriebene *lutABC* Operon sowohl in gram-positiven, als auch gram-negativen Bakterien weit verbreitet und scheint ein gängiger Stoffwechselweg zur Verwertung von L-Lactat zu sein (Chai *et al.*, 2009, Hwang *et al.*, 2013). In *Bacillus subtilis* wird die Expression von *lutABC* unter der Anwesenheit von L-Lactat induziert und steht hierbei unter der zweifachen Kontrolle des GntR-Repressors und dem SinR Protein, dem Hauptregulator für die Biofilmbildung (Chai *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu *lutABC* sind *sinR* und anderen

sinR-kontrollierte Gene im Genom anderer Organismen nicht weit verbreitet (Chai *et al.*, 2009). Anhand bioinformatischer Analysen wurde neben der cytoplasmatischen D-LDH (BVU_2499) aus *P. vulgatus* ein Operon identifiziert, welches, homolog zu *lutABC*, die Gene *Ilde* (*bvu_2876*), *Ildf* (*bvu_2877*) und *Ildg* (*bvu_2878*) kodiert. In dieser Arbeit durchgeführte bioinformatische Strukturanalysen zeigten, dass die Enzyme IldE, IldF und IldG Eisen-Schwefel Cluster enthalten. Dies legt nahe, dass die Oxidation von Lactat über eine anaerobe Elektronentransportkette erfolgt und vermutlich in der Membran verankert ist. Diese Annahme ist auch in der Literatur vertreten (Chai *et al.*, 2009). Auf bioinformatischer Ebene konnte für die kodierenden Gene des LutEFG Komplexes *Ilde* (*bvu_2876*), *Ildf* (*bvu_2877*) und *Ildg* (*bvu_2878*) in *P. vulgatus* jedoch keine transmembrane Helix ausgemacht werden. Zur Überprüfung der Aktivität der entsprechenden Enzyme wurden photometrische Tests mit Membranen von *P. vulgatus* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass trotz der zum *ldh* Gen vergleichsweise hohen Expression der Gene *Ilde*, *Ildf* und *Ildg*, keine Aktivität des LutEFG Komplexes an der Membran von *P. vulgatus* bestätigt werden konnte, obwohl dies aus thermodynamischer Sicht möglich gewesen wäre (siehe Kapitel 3,4). Weder mit Lactat, noch mit Pyruvat als Substrat wurde eine entsprechende Umwandlung nachgewiesen. Auch unter Einsatz von Methylviologen als alternativer Elektronendonator und Pyruvat als Substrat konnte keine Reduktion zu Lactat, katalysiert durch die Aktivität des LutEFG Komplexes, bestätigt werden. Demnach scheinen die Gene *Ilde*, *Ildf* und *Ildg* zwar in *P. vulgatus* transkribiert zu werden, die entsprechenden Enzyme weisen jedoch keine Aktivität unter den gewählten Bedingungen auf. Die Auswirkungen der Deletion von *bvu_2499* in *P. vulgatus* (siehe Kapitel 4.6.3.) untermauert diese Annahme. Durch die Unterbindung der Bildung der D-LDH in *P. vulgatus*, wurde der Syntheseweg zu Lactat unterbrochen. Die Tatsache, dass nach der Deletion von *ldh* (*bvu_2499*) in *P. vulgatus* kein Lactat mehr im Kulturüberstand des Organismus nachzuweisen war, liefert einen zusätzlichen Nachweis, dass der LutEFG-Komplex nicht zur Bildung von Lactat in *P. vulgatus* beiträgt.

Für die homologe Überproduktion der D-LDH in *P. vulgatus* wurde das Gen *bvu_2499* in die Expressionsvektoren pG106 und pMM656 kloniert, inklusive 250 bp des stromaufwärts gelegenen Sequenzbereichs für die Initiation der Transkription. Mittels qPCR wurde anschließend die Kopienzahl von *ldh* bestimmt, um die Bedingungen einer Überexpression von Genen besser analysieren zu können. *P. vulgatus* besitzt eine chromosomal kodierte Kopie des *ldh* Gens. Demnach war es offensichtlich, dass bei *P. vulgatus* pMM656_IdhNp, durch die Integration des Plasmidrückgrats über das 3'-Ende des Gens *bvu_2094*, eine zweite Kopie von *ldh* detektiert wurde. Die Anzahl der *ldh*-Kopien der *shuttle*-Vektor tragenden Mutante deutete auf eine Kopienzahl von 30 für pG106 in *P. vulgatus* hin. Die Konstruktion von pG106 liegt dem Plasmidrückgrat von pUC19 zugrunde, einem der am häufigsten verwendeten Klonierungsvektoren für *E. coli*. Demnach ist die Kopienzahl von pG106 in *E. coli* mit über 1000 sehr

Auch in *B. fragilis* weisen die stromaufwärts gelegenen Sequenzbereiche verschiedener Gene, wie *recA*, *fruA* und *sod*, teilweise nur 50 % Übereinstimmung zu den Konsensussequenzen -33 (T)TTG und -7 TAnnTTTG auf (Bayley *et al.*, 2000). Schlussfolgernd treffen wohlmöglich die Sequenzbereiche -33 (T)TTG und -7 TAnnTTTG nicht auf alle Promotorstrukturen in Spezies des Phylums Bacteroidota zu (Bayley *et al.*, 2000), sodass finale Untersuchungen für die Definition einer übergreifenden Promotorstruktur weiterhin ausstehen.

Neben der gesteigerten Konzentration an *ldh*-Transkript in *P. vulgatus* pG106_IdhnP, war auch die Enzymaktivität der D-LDH in der Überexpressionsmutante im Verhältnis zum Wildtyp um den Faktor 200 erhöht. Der Anstieg der Transkriptabundanz und der Enzymaktivität deuteten erstmals darauf hin, dass sich das pG106 *shuttle*-Vektor basierte System für eine gezielte Überproduktion von Proteinen, hier von D-LDH als Fallbeispiel, eignet. Die erhöhte Menge der D-LDH in *P. vulgatus* pG106_IdhnP wirkte sich auf die Zusammensetzung der Endprodukte aus. Der *P. vulgatus* Wildtyp bildete nur geringe Mengen an Lactat (< 1 mmol/g TG). Die gesteigerte Aktivität der D-LDH in der *shuttle*-Vektor basierten Mutante führte jedoch im Vergleich zum Wildtyp zu einer 11,4-fachen Steigerung der Lactatkonzentration. Mit 8,3 mmol/g TG lag die gebildete Konzentration von Lactat im Bereich der von *P. vulgatus* gebildeten Haupt-Stoffwechselendprodukte Succinat und Acetat. Allerdings bildete *P. vulgatus* pG106_IdhnP im Vergleich zum Wildtyp geringere Mengen an Succinat (- 2,3 mmol/g TG) und Acetat (- 1,1 mmol/g TG) und zeichnete sich durch einen höheren Glucoseverbrauch (+ 1,9 mmol/g TG) aus. Somit wurde vermutlich durch den vermehrten Substratverbrauch und die geringeren Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte Succinat und Acetat die erhöhte Lactatmenge, welche durch *P. vulgatus* pG106_IdhnP im Vergleich zum Wildtyp gebildet wurde, kompensiert. Durch die homologe Expression von *ldh* konnte somit der Stoffwechsel von *P. vulgatus* gezielt manipuliert und das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte hin zu Lactat verschoben werden. Unter Einbezug des Substratverbrauchs konnte die Ausbeute an Lactat durch die Überproduktion der D-LDH in *P. vulgatus* (0,2 g Lactat/g Glucose) um das 10-fache im Vergleich zum Wildtyp (0,02 g Lactat/g Glucose) gesteigert werden. Unter Berücksichtigung der für den katabolen Stoffwechsel verwendeten Glucosemenge (14,4 mmol Glucose/g TG) stieg dadurch der Anteil von Lactat am gesamten katabolen Kohlenstofffluss von 2,9 % (Wildtyp) auf 28,8 % an. Zusammengefasst wurde durch die gesteigerte Produktion von Lactat durch die *shuttle*-Vektor tragende Mutante belegt, dass pG106 als Expressionssystem für die homologe Expression von Genen in *P. vulgatus* geeignet ist. Dadurch wurde die Grundlage für eine genetische Optimierung von *P. vulgatus*, im Hinblick auf eine biotechnologische Anwendung zur Steigerung der Produktion von Plattformchemikalien (wie Succinat), geschaffen.

Auch wenn in dieser Arbeit die Überproduktion von Succinat durch *P. vulgatus* im Mittelpunkt steht, so eignet sich dieser Organismus möglicherweise auch für eine biotechnologische Lactatproduktion. Lactat, auch als Salz der Milchsäure bekannt, ist ein wichtiger Baustein vieler Verbindungen innerhalb der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie. Als Plattformchemikalie findet Lactat Anwendung in der Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen, Tensiden und Kosmetika, sowie von Poly-Lactat (PLA) als biologisch abbaubares Polymer für die Bildung von Fasern und Folien (Chang *et al.*, 1999; Upadhyaya *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2018). Die physikalischen Eigenschaften von PLA sind abhängig von der isomeren Zusammensetzung des Polymers (Abdel-Rahmen *et al.*, 2011). L-Lactat wird für die Synthese von Poly-L-Lactat (PLLA) eingesetzt, ein teilweise kristallines, biologisch abbaubares und thermostabiles Polymer, was vor allem für die Herstellung von Verpackungen verwendet wird (Abdel-Rahmen *et al.*, 2011). Weiterhin zeichnet sich dieses Polymer durch eine hohe Zugfestigkeit und geringe Dehnung aus, wodurch es sich für die Herstellung medizinischer Produkte eignet, welche in Bereichen der Kardiologie und Zahnmedizin Anwendung finden (John *et al.*, 2006). D-Lactat wird für die Herstellung von Poly-D-Lactat (PDLA) eingesetzt und bezeichnet sich ebenfalls durch eine hohe Schmelztemperatur und mechanische Stärke (Radano *et al.*, 2000; Tsuji, 2005; John *et al.*, 2009). Somit ist vor allem die Synthese von reinem L- oder D-Lactat eine Voraussetzung für die Fertigung von PLA. Industriell kann Lactat entweder über chemische Synthesewege oder fermentative Prozesse generiert werden. Eine chemische Herstellung aus petrochemischen Ressourcen führt allerdings zu einem Racemat aus D- und L-Lactat (Hofvendahl und Hahn-Hägerdal, 2000). Im Gegensatz dazu gewährleisten fermentative Produktionsprozesse von Lactat die Synthese des bevorzugten Stereoisomers durch die Auswahl entsprechender Mikroorganismen (Datta *et al.*, 1995; Ilmen *et al.*, 2007). Die Wirtschaftlichkeit der fermentativen Lactatproduktion hängt von einigen Faktoren ab, unter denen vor allem die Kosten der eingesetzten Rohstoffe eine Rolle spielen. Die Verwertung von Zuckern, wie Glucose, Saccharose oder Stärke als Substrat für die Produktion von Lactat ist sehr kostspielig. Aus diesem Grund nimmt die Senkung der Produktionskosten, vor allem durch die Verwertung preiswerter Substrate, an Bedeutung zu. Lignocellulose-haltige Biomasse, als nachhaltiges und kostengünstiges Substrat, stellt in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Rohstoff für die Lactatproduktion dar (Abdel-Rahmen *et al.*, 2011). Wie bereits erwähnt, besitzen Arten der Ordnung *Bacteroidales*, *P. vulgatus* eingeschlossen, Enzymsysteme für den Abbau komplexer, pflanzlicher Polysaccharide (Hill, 1995; Dodd *et al.*, 2010). Dadurch wird der Nutzen von *P. vulgatus* als fermentativer Lactatproduzent bestärkt. Etwa 70-90 % der weltweiten Produktion von Lactat wird derzeit durch fermentative Produktionsprozesse hergestellt, wobei vor allem Milchsäurebakterien eingesetzt werden (Abedi und Hashemi, 2020). Allerdings zeichnen sich diese Organismen durch einen komplexen Nährstoffbedarf, geringe Wachstumsraten und niedrige Fermentationstemperaturen aus (Abedi und Hashemi, 2020),

wodurch Produktionskosten steigen und das Risiko der Kontamination erhöht wird. In den letzten Jahrzehnten wurden daher auch Pilze, wie *Rhizopus (R.) oryzae* (Ganguly *et al.*, 2007; Thongchul *et al.*, 2010; Abdel-Rhman *et al.*, 2013) und Arten der Gattung *Bacillus*, sowie *E. coli* und *Saccharomyces (S.) cerevisiae* als alternative Produzenten eingesetzt (Chang *et al.*, 1999; Colombié *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2018). Die Verwendung dieser Organismen ermöglichte eine Optimierung in den Bereichen des Substratspektrums, der Ausbeute und Produktivität, des Nährstoffbedarfs, sowie der Reinheit des Produkts (Zhou *et al.*, 2003). Auch bei der biotechnologischen Produktion von Lactat führten genetische Modifikation des Stoffwechsels der Organismen, wie die heterologe Expression der LDH, zu einer Steigerung der Effizienz im Hinblick auf die Produktionsausbeute von Lactat (Chang *et al.*, 1999; Colombié *et al.*, 2003; Abedi und Hashemi, 2020). In *E. coli* wurde durch die Deletion der Phosphotransacetylase und Alkohol-Dehydrogenase in Kombination mit der Überexpression einer L-LDH aus *Lactobacillus casei* ein Ertrag von 0,9 g Lactat/g Glucose erzielt (Chang *et al.*, 1999). Die heterologe Expression einer LDH aus *Lactobacillus*-Stämmen in *S. cerevisiae* führte zu Ausbeuten von 0,04-0,9 g Lactat/g eingesetzten Substrat (Valli *et al.*, 2006; Abdel-Rahmen *et al.*, 2011; Abdel-Rahmen *et al.*, 2013). Somit könnte auch die Lactatproduktion durch weitere genetische Modifikationen des Stoffwechsels von *P. vulgatus* pG106_ldhnP optimiert werden, unter anderem durch die Deletion von Genen, welche an der Bildung von Nebenprodukten beteiligt sind. Als Beispiel wäre hier die Deletion von *bvu_2880* anzuführen, welches für die PFL in *P. vulgatus* kodiert und somit für die Bildung von Formiat verantwortlich ist. Durch die Deletion von *bvu_2880* würde mehr Pyruvat für die Reduktion zu Lactat in *P. vulgatus* pG106_ldhnP zur Verfügung stehen. Die Auswirkung der Deletion von *bvu_2880* in *P. vulgatus* Wildtyp (siehe Kapitel 4.6.2.) deutet bereits darauf hin, dass durch die Unterbindung der Synthese von Formiat eine Steigerung der Lactatproduktion in *P. vulgatus* pG106_ldhnP möglich sein könnte. Weiterhin ist anzumerken, dass *P. vulgatus* im Allgemeinen bereits in einem Minimalmedium zu hohen Zelldichten heranwächst, welche mit kurzen Verdopplungszeiten erreicht werden. Hierdurch bietet *P. vulgatus* bereits wünschenswerte Eigenschaften für die biotechnologische Produktion von Plattformchemikalien, wie Lactat und Succinat.

4.3. Biotechnologische Produktion von Succinat

Die Biotechnologie umfasst jede technologische Anwendung, welche sich mit dem Nutzen biologischer Systeme, Enzymen und lebenden Organismen befasst. Das Ziel ist die Entwicklung und Verbesserung von Verfahren zur Herstellung chemischer Verbindungen (Heux *et al.*, 2015). Beispiele der modernen Biotechnologie sind die Herstellung der Citronensäure mit *Aspergillus niger*, von Penicillin mit *Penicillium chrysogenum* und die Herstellung von Somatotropin und Insulin über rekombinante *E. coli*-Stämme (Kircher *et al.*, 2020). In den letzten Jahren wurde ein Farbschema eingeführt, um diese weit gefasste Definition der Biotechnologie, je nach Anwendungsbereich, besser eingrenzen zu können (Kafarski, 2012). Neben der grünen und roten Biotechnologie, welche landwirtschaftliche und medizinische Bereiche umfassen, beschreibt die weiße Biotechnologie die Produktion chemischer Verbindungen durch den Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen (Soetaert und Vandamme, 2006; Heux *et al.*, 2015). Der Schwerpunkt der weißen Biotechnologie, auch als industrielle Biotechnologie bezeichnet, ist der Ersatz fossiler Ressourcen durch umweltfreundliche und erneuerbare Rohstoffe, mit dem Ziel petrochemische Herstellungsprozesse durch biologische Prozesse ersetzen zu können. Neben der Senkung des Energie- und Rohstoffbedarfs hat dies auch die Minimierung von Prozessstufen zum Vorteil (Dale, 2003; Soetaert und Vandamme, 2006). Vor allem durch das wachsende Verständnis für den Klimawandel und die steigenden Öl- und Gaspreise gewinnt der Umstieg konventionell petrochemisch-basierter Produktionsprozesse hin zu biologischen Systemen, unter Einsatz nachwachsender Rohstoffe, zunehmend an Bedeutung (Dessie *et al.*, 2018; Tylecote, 2019; Li *et al.*, 2020; Nasser *et al.*, 2021) und ist in den Mittelpunkt umfangreicher Forschungsarbeiten gerückt (Burk und Dien, 2016). Dabei gilt die biobasierte Herstellung von Plattformchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen als eine der Lösungen zur Bekämpfung der Abhängigkeit von endlichen fossilen Ressourcen. Im Fokus dessen steht auch der Herstellungsprozess der wichtigen Plattformchemikalie Succinat, welche in diesem Zusammenhang auch als Bio-Succinat bezeichnet wird (Becker *et al.*, 2015).

Als eine der weltweit wichtigsten Plattformchemikalien dient Succinat zur Herstellung von Pigmenten, Kosmetika, Detergenzien, sowie von Lösungsmitteln und biobasierten Polymeren wie Polybutylensuccinat (Nghiem *et al.*, 2017; Saxena *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018). Mit einer jährlichen Wachstumsrate von 27,4 % erreicht Succinat im Jahre 2025 einen voraussichtlichen Marktanteil von 1,8 Milliarden USD, was einer Menge von umgerechnet etwa 800.000 T und einem Preis von 2,3 USD/kg entspricht (Nghiem *et al.*, 2017). In Europa fallen jährlich etwa 25,8 Millionen T von Kunststoffabfällen an (Narancic *et al.*, 2020). Da die weitverbreitete Verwendung von Plastik ein großes Umweltproblem darstellt, gab dies den Anstoß zur Erforschung biobasierter und biologisch abbaubarer Polymere, auch als Bio-Plastik bezeichnet (Nakajima *et al.*, 2017). Somit wurde die Synthese von Polymeren wie PLA, Polyhydroxyalkanoate (PHA) und Succinat-basierten Polymeren in den letzten

Jahren ausgiebig erforscht und vermarktet (Chen *et al.*, 2018; Aliotta *et al.*, 2019; Cinelli *et al.*, 2019; Gigante *et al.*, 2019; Coiai *et al.*, 2021). Einige wichtige synthetische biologisch abbaubare Polyester auf Basis von Succinat sind Polyethylensuccinat (PES), Polypropylensuccinat (PPS), Polybutylenadipat (PBA) und Polybutylensuccinat (PBS). In industriellem Maßstab erfolgt die petrochemische Erzeugung von Succinat heutzutage überwiegend im Zuge einer chemischen Synthese aus raffiniertem Erdöl über Maleinsäureanhydrid durch mehrfache Hydratation (Pinazo *et al.*, 2015; Nghiem *et al.*, 2017, Xu *et al.*, 2018). Neben den hohen Temperaturen und Drücken, die für den Herstellungsprozess benötigt werden, gehen mit dieser Produktion auch komplexe und kostenaufwändige Aufreinigungsschritte, ein hoher Energieverbrauch und aufwändige Reaktionsbedingungen einher (Zeikus *et al.*, 1999; Louasté und Eloutassi, 2020). Ebenso bringt diese Methode neben der begrenzten Verfügbarkeit der Ressourcen den Nachteil der Umweltverschmutzung und der Freisetzung von CO₂ mit sich (Dai *et al.*, 2019). Aufgrund des enormen Potenzials als nachhaltige Plattformchemikalie, nahm in den letzten Jahren die Herstellung von biobasiertem Succinat an Bedeutung zu (Díaz *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2015; Ahn *et al.*, 2016; Nghiem *et al.*, 2017). Das breite Spektrum an umweltfreundlichen und erneuerbaren Ressourcen, hohe Ausbeuten und die Effizienz des Herstellungsprozesses, machen die fermentative Produktion von Succinat wettbewerbsfähig im Vergleich zu petrochemischen Synthesewegen (Willke und Vorlop, 2004; Hermann *et al.*, 2007; Cok *et al.*, 2014). Theoretisch können durch die biologische Produktion von 1 kg Succinat mindestens 0,37 kg CO₂ gebunden werden, was vor allem aus umwelttechnischer Sicht einen Vorteil gegenüber dem chemisch basierten Herstellungsprozess darstellt (Wang *et al.*, 2011). Bereits mehrere Unternehmen haben mit der Entwicklung biobasierter Succinat-Produktionen begonnen (Jansen und Gulik, 2014). Nach aktuellem Stand sind die Hauptakteure der industriellen Synthese von Bio-Succinat, entsprechend der Reihenfolge, BASF SE, Roquette Frères und Kawasaki Kasei Chemicals (Mordor Intelligence, 2021). Hauptsächlich erfolgt die Herstellung von Bio-Succinat über Batch- und Fed-Batch Prozesse (Jansen und Gulik, 2014), aber auch kombinierte Fed-Batch Ansätze mit Zell-Recycling oder kontinuierlichen Verfahrenstechniken werden verwendet (Scholten *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). Allerdings limitieren Faktoren, wie hohe Kosten der Ausgangssubstrate und Kultivierungsmedium, geringe Produktausbeuten, sowie die Bildung von Nebenprodukten (Acetat, Formiat, Lactat und Propionat) die wirtschaftliche Wettbewerbsfähigkeit der biobasierten Succinat-Produktion (Zeikus *et al.*, 1999; Cukalovic und Stevens, 2008; Cheng *et al.*, 2013).

Als Intermediat des Citratzyklus, des Glyoxylatwegs und als Endprodukt der Fumarat-Atmung, wird Succinat durch eine Vielzahl von Mikroorganismen gebildet (van der Werf *et al.*, 1997; Nghiem *et al.*, 2017; Jantama *et al.*, 2008; Dittrich *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010). Die meisten dieser Organismen, die Succinat auf natürliche Weise in signifikanten Mengen produzieren, sind anaerobe Pansen-Bakterien

(Beauprez *et al.*, 2010; Ahn *et al.*, 2016). Dazu zählen *Actinobacillus (A.) succinogenes* (Guettler *et al.*, 1996), *Anaerobiospirillum (A.) succiniciproducens* (Davis *et al.*, 1976), *Mannheimia (M.) succiniciproducens* (Lee *et al.*, 2002) und *B. fragilis* (Beauprez *et al.*, 2010). Unabhängig von der Wahl des Organismus ist die Optimierung des Stoffwechsels durch gezielte genetische Modifikationen für eine industrielle Succinat-Produktion weitestgehend unausweichlich. Im Fokus dessen steht die Verstärkung Succinat-bildender Stoffwechselwege durch die Überexpression entsprechender Gene, sowie die Minimierung von Nebenprodukten durch die Deletion verantwortlicher Gene. Weiterhin stellt auch die Optimierung von Produktionsparametern einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur Steigerung der Succinat-Produktion dar. Mögliche Ansätze diesbezüglich umfassen die Auswahl eines effizienten Ausgangsmaterials, sowie die Anpassung der Substratkonzentration, die Zusammensetzung des Mediums und der Einsatz geeigneter Puffersysteme. Eine Erläuterung der Prozessoptimierung durch die Anpassung entsprechender Parameter wird in Kapitel 4.7.2 diskutiert. Bei den meisten Mikroorganismen, welche für industrielle Produktionsprozesse zur Herstellung von Succinat in Betracht kommen, sind organische Säuren wie Lactat, Formiat, Acetat, Propionat und Ethanol unerwünschte Nebenprodukte. Verschiedene Mikroorganismen wurden bereits als effiziente Succinat-Produzenten identifiziert und die genetische Manipulation des Stoffwechsels führte schlussendlich zu einer Steigerung der Produktionsausbeute einhergehend mit der Reduktion von Nebenprodukten (Jansen und van Gulik, 2014). Dazu zählen unter anderem *A. succinogenes* (Liu *et al.*, 2008), *A. succiniciproducens* (Bretz, 2015), *Basfia (B.) succiniciproducens* (Becker *et al.*, 2013), *Corynebacterium (C.) glutamicum* (Zhu *et al.*, 2014), *E. coli* (Jantama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Graber *et al.*, 2018), *M. succiniciproducens* (Lee *et al.*, 2002) und *Vibrio (V.) natriegens* (Thoma *et al.*, 2022). In Tabelle 22 und im folgenden Abschnitt werden Beispiele für Produzenten von Bio-Succinat gegenübergestellt.

Vor allem genetisch veränderte *E. coli*-Stämme zählen zu den effektivsten Succinat-Produzenten (Chang *et al.*, 2013). Auf natürliche Weise produziert *E. coli* geringe Mengen an Succinat im Zuge der gemischten Säuregärung (Clark, 1989; Lee *et al.*, 2005). Dabei sind die hauptsächlichen Endprodukte der anaeroben Fermentation von *E. coli* Acetat, Formiat, Lactat und Ethanol. Durch eine Vielzahl genetischer Modifikationen konnte der Kohlenstofffluss jedoch in Richtung Succinat gelenkt und die Bildung von Nebenprodukten reduziert werden. Die genomischen Modifikationen beinhalten die Verbesserung des Substrat- oder Produkttransports, die Überexpression und Deletion von Genen, welche direkt an Succinat-bildenden Stoffwechselwegen beteiligt sind. Dadurch konnten Erträge von etwa 1 g Succinat/g Substrat und Produktionstiter von über 50 g/l erzielt wurden (Jantama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2016; Graber *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2019). Dabei wurden für die Produktion Batch- oder Fed-Batch-Fermentationstechniken verwendet, wobei der Fermentationsprozess teilweise mit aeroben Kultivierungsbedingungen zur Steigerung der Zelldichte

initiiert wurde (Beauprez *et al.*, 2011; Balzer *et al.*, 2013). Beispielsweise führte in *E. coli* SD121 die Deletion der kodierenden Gene der Lactat-Dehydrogenase (*ldhA*), Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) und dem Gen *ptsG*, welches die Glucose-spezifische Permease des Phosphotransferasesystems kodiert, sowie der Überexpression der PEP-Carboxykinase zu einem Succinat-Titer von 116,2 g Succinat/l. Mit einem Ertrag von 1,7 mol Succinat/mol Glucose entsprach dies einer Ausbeute von 1,13 g Succinat/g Glucose (Wang *et al.*, 2011). Als weiteres Beispiel besitzt der *E. coli*-Stamm TG400 eine Mutation im Galaktose-Transporter kodierenden Gen *galP* und produziert 96 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,96 g Succinat/g Substrat (Graber *et al.*, 2018). Eine Reihe genetische Modifikationen des Stoffwechsels von *E. coli* KJ134 resultierten in einer Reduzierung der Nebenprodukte Acetat und Formiat und in einem vergleichbaren Ertrag an Succinat mit 1 g/g Glucose (Jantama *et al.*, 2008). Allerdings tritt bei biotechnologischen Herstellungsprozessen mit *E. coli* als Produktionsstamm bei hohen Substratkonzentrationen während des exponentiellen Wachstumsphase häufig das Phänomen des *overflow metabolism* auf (Basan *et al.*, 2015). Dabei akkumulieren neben gewünschten Endprodukten wie Succinat vermehrt Stoffwechselintermediate, wodurch der Succinat-Ertrag minimiert und die Aufreinigung des Produkts erschwert wird (Jantama *et al.*, 2008; van Heerden and Nicol, 2013; Basan *et al.*, 2015, Mancini *et al.*, 2019). Dennoch werden genetisch modifizierte *E. coli*-Stämme von den Firmen BioAmber (Pomacle, Frankreich) und Myriant (Luisiana, USA) für eine industrielle Produktion von Succinat eingesetzt (Nghiem *et al.*, 2017; Mancini *et al.*, 2019).

Anaerobe Pansenbakterien wie *A. succinogenes* und *A. succiniciproducens* bilden auf natürliche Weise bereits signifikante Mengen an Succinat (Davis *et al.*, 1976; Guettler *et al.*, 1996) (Tabelle 22). Bei *A. succinogenes* wurde mit Glucose als Substrat ein Succinat-Titer von 40-105,8 g/l und ein Ertrag von etwa 0,8 g Succinat/g Glucose beobachtet (Guettler *et al.*, 1996; Lui *et al.*, 2008; Pateraki *et al.*, 2016). Im Vergleich dazu erzielte *A. succiniciproducens* einen Succinat-Ertrag von 0,89 g Succinat/g Glucose mit einem Titer von 83 g Succinat/l (Meynial-Salles *et al.*, 2008). Unter Verwendung kostengünstigerer Substrate wie Glycerol und Molke wurden Succinat-Ausbeuten von 1,4 g/g Glycerin (Lee *et al.*, 2010) und 0,72 g/g Molke (Samuelov *et al.*, 1991) erreicht. Ein weiteres Bakterium, welches aus dem Pansen von Wiederkäuern isoliert und als vielversprechender Succinat-Produzent identifiziert wurde, ist *M. succiniciproducens* (Lee *et al.*, 2002). Auf natürliche Weise bildet dieser Organismus 13,5 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,68 g Succinat/ g Glucose (Lee *et al.*, 2002). Durch unterschiedliche genetische Modifikationen des Stoffwechsels konnte die Ausbeute an Succinat erhöht und die Bildung von Nebenprodukten reduziert werden. Beispielsweise resultierte die Deletion der Gene *ldhA* (Lactat-Dehydrogenase), *pflB* (Formiat-Acetyltransferase), *pta* (Phosphat-Acetyltransferase) und *ackA* (Acetat-Kinase) in *M. succiniciproducens* in einer Abnahme der Stoffwechselendprodukte Lactat, Formiat und Acetat und folglich in einer höheren Ausbeute an Succinat (Lee *et al.*, 2006). Dadurch konnte unter

Fed-Batch Fermentationsbedingungen ein Titer von 52,4 g/l Succinat und ein Ertrag von 0,8 g Succinat/g Glucose erzielt werden (Lee *et al.*, 2006). Ebenfalls als natürlicher Produzent von Succinat ist *B. succiniciproducens* anzugeben. Das aus dem Pansen isolierte Bakterium produziert natürlicherweise bis zu 20 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,49-0,6 g Succinat/g Glucose (Scholten und Dägele, 2008; Becker *et al.*, 2013). Genetische Manipulationen des Stoffwechsels führten zu einer Verschiebung des Kohlenstoffflusses hin zu Succinat, sodass bis zu 36,6 g/l Succinat und ein Ertrag von 1,26 g Succinat/g Glycerin erreicht werden konnte (Scholten *et al.*, 2011). Wie auch in den meisten zuvor aufgeführten genetisch manipulierten Organismen, führte die Deletion der Lactat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Formiat-Lyase zu dieser Steigerung der Succinat-Ausbeute.

Die Gegenüberstellung der verschiedenen Succinat-Produzenten verdeutlicht, dass vor allem durch genetische Modifikationen hohe Succinat-Erträge und -Titer erzielt werden konnten. Grundsätzlich ist hierbei anzumerken, dass durch zielgerichtete Gendeletionen die Bildung von Nebenprodukten zwar verringert, jedoch nicht unterbunden werden konnte. Dies erschwert die Produktaufreinigung und reduziert schlussendlich die Ausbeute von Succinat als gewünschtes Produkt (Basan *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2019). Folglich können auch die derzeit effizientesten Produktionsstämme die petrochemische Succinat-Produktion nicht ersetzen, da die Akkumulation von Nebenprodukten den industriellen Einsatz dieser Organismen aus wirtschaftlicher Sicht einschränkt. Gegenwärtig existiert kein Produktionsstamm, welcher, ohne die Bildung von Nebenprodukten, ausschließlich Succinat produziert. In Bezug auf eine industrielle Herstellung von Succinat wäre somit ein Produktionsstamm wünschenswert, welcher eine Homosuccinat-Fermentation, auf Basis erneuerbarer Ausgangsverbindungen, gewährleisten würde.

Tabelle 22: Übersicht ausgewählter Bio-Succinat-Produzenten und entsprechende Produktionsparameter.

Organismus	Substrat	Ertrag Succinat/Substrat		Succinat-Titer [g/l]	Fermentationsbedingung	Nebenprodukte	Anmerkung	Quelle
		[g/g]	[mol/mol]					
<i>E. coli</i>	Glucose	1,13	1,7	116,2	Batch	-	GVO, $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta ptsG$	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>E. coli</i>	Glucose	0,96	1,46	90,6	Batch	-	GVO, $\Delta galP$	Graber <i>et al.</i> , 2018
<i>E. coli</i>	Glucose	1	1,52	71,5	Batch	Acetat, Pyruvat, Malat, Formiat	GVO, $\Delta tdcE$, $\Delta ackA$, $\Delta adhE$, $\Delta aspC$, $\Delta citF$, $\Delta focA$, $\Delta ldhA$, $\Delta mgsA$, $\Delta sfcA$, $\Delta pflB$, $\Delta proxB$, $\Delta tdcD$, $\Delta pta-ackA$	Jantama <i>et al.</i> , 2008
<i>A. succinogenes</i>	Glucose	0,8	1,22	105,8	Batch	Acetat, Formiat, Propionat, Pyruvat	WT	Guettler <i>et al.</i> , 1996
<i>A. succinogenes</i>	Glucose	0,79	1,2	39,4	Batch	Acetat, Formiat	WT	Liu <i>et al.</i> , 2008
<i>M. succiniciproducens</i>	Glucose	0,68	1	13,5	Batch	Acetat, Formiat, Lactat	WT	Lee <i>et al.</i> , 2002
<i>M. succiniciproducens</i>	Glucose	0,8	1,22	52,4	Fed-Batch	Acetat, Formiat, Lactat	GVO, $\Delta ldhA$, $\Delta pflB$, Δpta , $\Delta ackA$	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>A. succiniciproducens</i>	Glucose	0,89	1,35	83	Batch	Acetat	WT	Meynial-Salles <i>et al.</i> , 2008
<i>A. succiniciproducens</i>	Glycerin	1,4	1	14	kontinuierlich	Acetat	WT	Lee <i>et al.</i> , 2010
<i>A. succiniciproducens</i>	Molke	0,72	-	24	Fed-Batch	Acetat	WT	Samuelov <i>et al.</i> , 1991
<i>B. succiniciproducens</i>	Glucose	0,6	0,9	5,8	Batch	Acetat, Formiat	WT	Scholten und Dägele, 2008
<i>B. succiniciproducens</i>	Glucose	0,49	0,74	20	Batch	Acetat, Formiat, Lactat, Ethanol	WT	Becker <i>et al.</i> , 2013
<i>B. succiniciproducens</i>	Glycerin	1,26	0,98	36,2	Batch	Acetat, Formiat, Lactat, Ethanol	GVO, Δldh , Δpfl	Scholten <i>et al.</i> , 2011
<i>V. natriegens</i>	Glucose	0,96	1,46	60,4	Batch	-	GVO, $\Delta lldh$, $\Delta dlsh$, Δpfl , Δald , $\Delta dns::dyc$	Thoma <i>et al.</i> , 2022

Darmbakterien sind von Natur aus in der Lage, eine Vielzahl nachwachsender Rohstoffe als Substrat für die Produktion von Succinat zu verstoffwechseln (Flint *et al.*, 2012). Für Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* wurde nachgewiesen, dass diese zu den häufigsten xylanolytischen Organismen der humanen Darmflora zählen und somit nachwachsende Ausgangsmaterialien, wie Hemicellulosen, verstoffwechseln können (Bryant *et al.*, 1958; Dehority, 1966; Chassard *et al.*, 2007). Außerdem wurde in mehreren Studien darauf hingedeutet, dass Arten des Phylums Bacteroidota die effizientesten Succinat- und Propionat-Produzenten des menschlichen Darms sind (Reichardt *et al.*, 2014; Salonen *et al.*, 2014). Dadurch zeichnet sich auch *P. vulgatus* als effizienter Produktionsorganismus für eine nachhaltige Bio-Succinat-Herstellung aus. Bisher wurden Spezies der Ordnung *Bacteroidales*, *P. vulgatus* eingeschlossen, für biotechnologische Verfahren zur effizienten und nachhaltigen Produktion von Succinat noch nicht eingesetzt. Allerdings werden der Gattung *Bacteroides* probiotische Eigenschaften zugesprochen (Tan *et al.*, 2019), weshalb auch *P. vulgatus* als zukünftig industrieller Produktionsstamm in Betracht gezogen werden kann. Weiterhin wurden bereits für die nahverwandten Arten *B. fragilis* und *P. copri* Untersuchungen hinsichtlich der Optimierung von Prozessparametern zur Bildung von Succinat unternommen (Isar *et al.*, 2006; Franke, 2020). In einem CaCO₃-gepufferten Batch-Verfahren erzielte *P. copri* einen Succinat-Titer von 25 g/l mit einer Produktionsrate von 0,7 g Succinat/g Glucose (Franke, 2020). Im Vergleich dazu produzierte *B. fragilis* 12,5 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,62 g Succinat/g Glucose (Isar *et al.*, 2006). Im Zuge dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *P. vulgatus* bereits ohne jegliche Optimierung der Succinat-Produktion in Serumflaschen mit einem Kulturvolumen von 50 ml einen Ertrag von etwa 0,3 g Succinat/g Glucose erzielte (siehe Kapitel 3.4.). Dies deckt sich mit beschriebenen Ergebnissen bezüglich des Ertrags von Succinat bei Wachstum auf Minimalmedium mit Glucose als Substrat (Franke, 2020). Durch genetische Modifikationen des Stoffwechsels, sowie durch Optimierung von Prozessparameter zur Steigerung des Succinat-Ertrags, könnte *P. vulgatus* demnach einen geeigneten Kandidaten für eine nachhaltige Succinat-Produktion darstellen.

4.4. Genetische Manipulation des Stoffwechsels von *P. vulgatus* zur Steigerung der Succinat-Produktion

Grundsätzlich basiert der Stoffwechsel von *P. vulgatus* auf dem EMP-Weg, der Fumarat Atmung mit der Bildung von Succinat und der Produktion von Acetat, Lactat und Formiat. Unter CO₂-Mangel wird Succinat weiter zu Propionat verstoffwechselt (Franke, 2020). Während Acetat und Succinat die beiden hauptsächlichen Endprodukte des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* darstellen, werden Formiat, Lactat und Propionat in deutlich geringeren Mengen gebildet. Aus industrieller Sicht

wäre ein Produktionsstamm von Bio-Succinat ideal, welcher aus nachwachsenden Rohstoffen, wie Hemicellulosen, ausschließlich Succinat ohne jegliche Nebenprodukte bilden würde. Für die Generierung eines Homosuccinat-Produzenten müssten folglich genetische Modifikationen des Stoffwechsels von *P. vulgatus* vorgenommen werden, um die Bildung von Nebenprodukten (Acetat, Formiat, Propionat und Lactat) zu unterbinden. Da für die Bildung von Succinat Reduktionsäquivalente [H] in Form von NADH benötigt werden, ist ebenso die Überexpression von Genen, welche an [H]-bereitstellenden Stoffwechselwegen beteiligt sind, vielversprechend.

4.4.1. Homologe Expression von Genen des oxidativen Citratzyklus aus *P. vulgatus*

Als anaerober Fumarat-Atmer bildet *P. vulgatus* Succinat natürlicherweise über den reduktiven und oxidativen Abschnitt des nicht-geschlossenen Citratzyklus, wobei beide Wege mit der Bildung von Succinat enden (Abb. 60; Baughn und Malamy, 2003; Garschagen, 2022). Allerdings basiert die zellulär relevante Succinat-Produktion auf dem reduktiven Teil. Dieser Abschnitt des Citratzyklus wird durch die Reduktion von Oxalacetat zu Malat, katalysiert durch die Malat-Dehydrogenase (BVU_0462), eingeleitet. Diese Reaktion ist gekoppelt mit der Oxidation von NADH zu NAD⁺. Anschließend wird Malat durch die Fumarase (BVU_1859) unter Wasserabspaltung zu Fumarat umgewandelt. Fumarat dient im Zuge der anaeroben Fumarat-Atmung als terminaler Elektronenakzeptor. Durch die membrangebundene Fumarat-Reduktase werden die Elektronen von reduziertem Menachinon auf Fumarat übertragen, wodurch Fumarat zu Succinat reduziert wird (Abb. 60; Franke, 2020). Aus diesem Grund eignen sich vor allem Organismen, welche Fumarat-Atmung betreiben, für eine biotechnologische Succinat-Produktion. Zusammenhängend basieren die meisten zugelassenen Patente auf einer fermentativen Herstellung von Succinat durch anaerobe Pansen-Bakterien (Cukalovic und Stevens, 2008). Eine bioinformatische Analyse des oxidativen Abschnitts des Citratzyklus aus *P. vulgatus* wurde bereits in der Dissertation von Garschagen (2022) behandelt. Ausgehend von den Molekülen Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat, welche im zentralen Kohlenstoffmetabolismus gebildet werden, erfolgt im oxidativen Abschnitt des nicht-geschlossenen Citratzyklus die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat (Abb. 60).

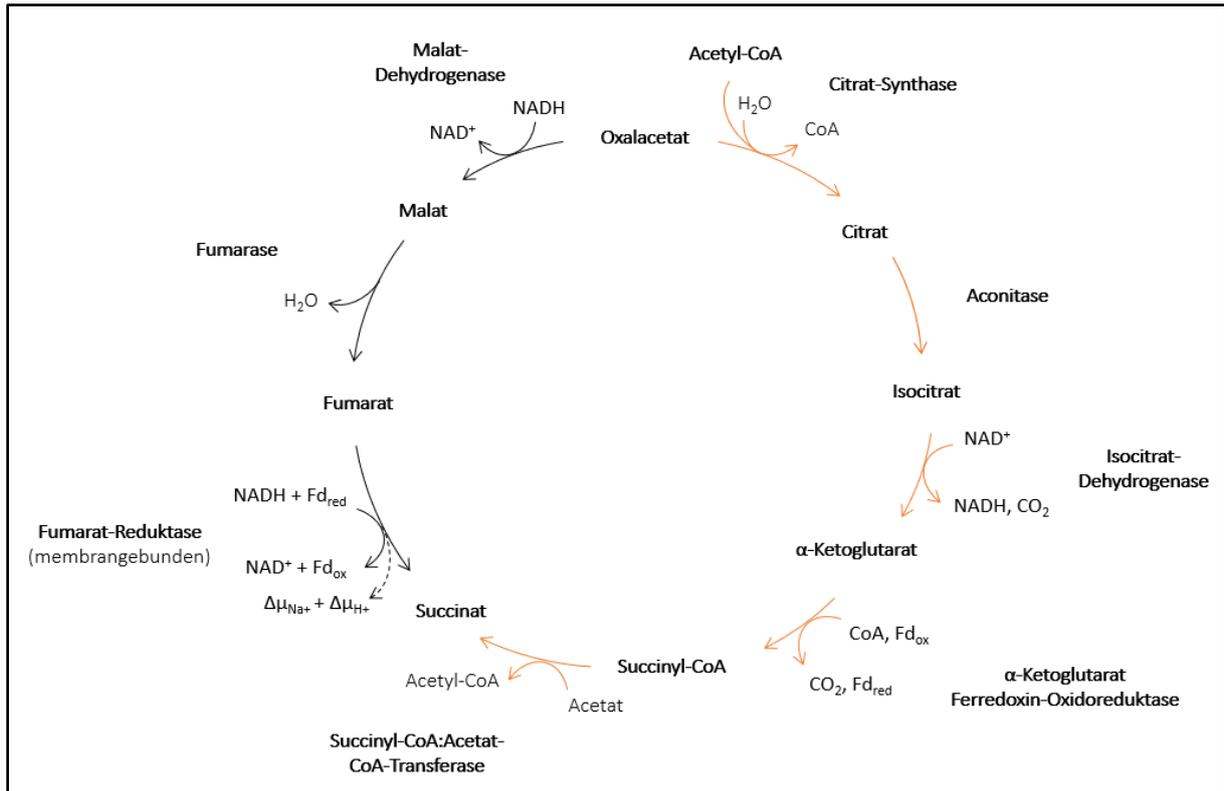


Abbildung 60: Schematische Darstellung des nicht-geschlossenen Citratzyklus in *P. vulgatus*. Der oxidative Teil ist durch orange Pfeile und der reduktive Teil durch schwarze Pfeile dargestellt. CoA = Coenzym A; Fd_{ox} = oxidiertes Ferredoxin; Fd_{red} = reduziertes Ferredoxin.

Katalysiert wird diese Reaktion unter Abspaltung von CoA durch die Citrat-Synthase (BVU_1961). Es folgt die Isomerisierung von Citrat, durch die Aconitase (BVU_1959), in zwei Schritten zu Isocitrat. Durch eine Dehydratisierung von Citrat entsteht zunächst *cis*-Aconitat und durch anschließende Hydratisierung Isocitrat. Im nächsten Schritt wird Isocitrat durch die Isocitrat-Dehydrogenase (BVU_1960) oxidiert und decarboxyliert. Dabei entsteht NADH, CO₂ und α-Ketoglutarat. Anschließend katalysiert die α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_0978 und BVU_0979) in Abhängigkeit von CoA die Oxidation von α-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Auch bei dieser Reaktion läuft eine Decarboxylierung des Substrats ab. Als Elektronenakzeptor dieser Reaktion dient oxidiertes Ferredoxin (Fd_{ox}). Im nächsten Schritt wird üblicherweise Succinyl-CoA durch eine Succinyl-CoA-Synthetase zu Succinat reduziert. Ein entsprechendes Gen ist jedoch im Genom von *P. vulgatus* nicht kodiert. Stattdessen wird Succinyl-CoA durch eine Succinyl-CoA:Acetat-CoA-Transferase (SCACT; BVU_1163) zu Succinat umgeformt, wobei das durch die SCACT abgespaltene CoA auf ein Acetat-Molekül übertragen wird (Garschagen, 2022). Das freigesetzte Acetyl-CoA kann durch die Citrat-Synthase wieder recycelt werden, indem es in den oxidativen Abschnitt des Citratzyklus eingespeist wird (Abb. 60).

Die Atmungskette von *P. vulgatus* kann als Verbindung zwischen dem oxidativen und reduktiven Abschnitt des Citratzyklus betrachtet werden. Es ist möglich, dass Reduktionsäquivalente in Form von

NADH und Fd_{red} aus dem oxidativen Abschnitt des Citratzyklus über die Malat-Dehydrogenase (Oxidation von NADH zu NAD^+) und über die Komplexe der Atmungskette (Fumarat-Atmung) wieder re-oxidiert werden, sodass diese dem oxidativen Abschnitt des Citratzyklus wieder zur Verfügung stehen. Die entsprechenden Komplexe der Atmungskette werden in Kapitel 1.2.1. genauer erläutert. Unter anaeroben Bedingungen ist die Ausbeute von Succinat durch die Verstoffwechslung von Zuckern abhängig von der Verfügbarkeit an NADH (Lee *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Die Verwertung von einem Molekül Glucose über den EMP-Weg führt lediglich zur Generierung von 2 Molekülen NADH. Hierbei werden final zwei Moleküle PEP gebildet, die zu zwei Molekülen OAA carboxyliert, anschließend zu zwei Molekülen Malat reduziert und schlussendlich zu zwei Succinat-Molekülen umgewandelt werden können. Die Bildung von einem Molekül Succinat benötigt somit 2 Moleküle NADH. Daher ist die limitierte Bereitstellung von NADH das Hauptproblem einer hohen Succinat-Ausbeute. Unter der Annahme, dass Succinat ausschließlich über den reduktiven Abschnitt gebildet wird, ist die maximal theoretische Ausbeute von Succinat aus einem Molekül Glucose somit auf eins beschränkt. Die Gesamtausbeute von Succinat könnte allerdings durch eine Erhöhung der intrazellulären NADH-Verfügbarkeit gesteigert werden.

Die generierten [H] im oxidativen Abschnitt des Citratzyklus werden natürlicherweise für den Anabolismus und somit für den Aufbau der Zellbiomasse eingesetzt. Eine Überexpression von Genen des oxidativen Citratzyklus könnte jedoch zu einer gesteigerten Bereitstellung von [H] dienen, welche zur Bildung von Biomasse und von Succinat an der Membran zur Verfügung stünden. Garschagen (2022) stellte die Annahme auf, dass dadurch sogar die [H]-Versorgung für die Bildung von Succinat über den reduktiven Teil gedeckt werden könnte. Folglich würden der reduktive und oxidative Teil des Citratzyklus miteinander gekoppelt werden und die Notwendigkeit der [H]-Bildung über andere Stoffwechselwege minimiert. Zusätzlich könnte dadurch eine reduzierte Bildung von Nebenproduktbildung begünstigt werden.

Um zu untersuchen, welches Gen auf Transkript-Ebene einen möglichen „Flaschenhals“ des oxidativen Citratzyklus-Abschnitts darstellt, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Transkriptanalyse der entsprechenden Gene durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.1.). Dadurch konnte gezeigt werden, dass alle Gene des oxidativen Abschnitts in *P. vulgatus* exprimiert werden. Die kodierenden Gene der Citrat-Synthase (*bvu_1961*), Isocitrat-Dehydrogenase (*bvu_1960*) und Aconitase (*bvu_1959*), welche chromosomal in einem Operon vorliegen, wiesen im Vergleich zu den Genen der α -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und SCACT geringere Transkriptabundanzen auf (Abb. 22). Es konnte bereits *in vivo* gezeigt werden, dass in *P. vulgatus* die Enzymaktivitäten der Citrat-Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase im Vergleich zu den Aktivitäten der α -Ketoglutarat-Ferredoxin-

Oxidoreduktase und SCACT ein geringeres Level aufweisen (Garschagen, 2022). Dies untermauert das Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptanalyse. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Aktivitäten der Enzyme und der Membrankomplexe des reduktiven Abschnitts des Citratzyklus in Bezug auf die Enzymaktivitäten des oxidativen Abschnitts eine Steigerung um den Faktor 700 aufzeigen (Garschagen, 2022). Für die Generierung eines Homosuccinat-Produzenten auf Basis des nicht-geschlossenen Citratzyklus müssten folglich die Aktivitäten der Enzyme des oxidativen Abschnitts auf das Aktivitäts-Level der Enzyme des reduktiven Teils angepasst werden, um den Bedarf an [H] für die Bildung von Succinat durch den reduktiven Abschnitt (anaerobe Fumarat-Atmung) decken zu können. Aufgrund der limitierenden Transkriptabundanz der kodierenden Gene der Citrat-Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase (*bvu_1959-61*) war eine homologe Überexpression entsprechender Gene, in Bezug auf eine Bereitstellung von [H] für die Bildung von Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus, vielversprechend. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass in *C. glutamicum* die homologe Überexpression der Citrat-Synthase zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute um 22 % führte (Zhu *et al.*, 2013). Da die Citrat-Synthase den Fluss von Acetyl-CoA des Citratzyklus kontrolliert (Weitzman und Jones, 1968; Wiegand und Remington, 1986) wird durch die Aktivität dieses Enzyms die Grundvoraussetzung für den Ablauf des oxidativen Citratzyklus geschaffen. In dieser Arbeit resultierte die homologe Expression der Gene *bvu_1959*, *bvu_1960* und *bvu_1961* in einer bis zu 400-fachen Steigerung der Transkriptmenge (Abb. 24). Allerdings konnte nur durch die Überproduktion der Aconitase eine Erhöhung der Succinat-Ausbeute um etwa 13 % erzielt werden (siehe Kapitel 3.6.1.). Die Überexpression der kodierenden Gene der Citrat-Synthase und Isocitrat-Synthase führten hingegen nicht zu einer gesteigerten Succinat-Produktion. Bei den von Garschagen (2022) durchgeführten Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme des oxidativen Citratzyklus in cytoplasmatischen Fraktionen von *P. vulgaris* wies die Aconitase im Vergleich zur Citrat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase nur 8 bzw. 26 % der Enzymaktivität auf. Folglich scheint auf enzymatischer-Ebene vor allem die Aconitase einen limitierenden Einfluss auf die Bildung von Succinat und die Erzeugung von [H] über den oxidativen Abschnitt des Citratzyklus zu haben. Die Überexpression von *bvu_1959* (Aconitase) und die darauf basierende Proteinbiosynthese resultierte in einer höheren Enzymaktivität der Aconitase (siehe Kapitel 3.6.1.). Durch die im Vergleich grundsätzlich höhere Enzymaktivität der Citrat-Synthase steht genügend Citrat zur Verfügung, welches im Wildtyp durch die limitierende Aktivität der Aconitase, mit geringerer Umsetzung zu Isocitrat verstoffwechselt wird. Vermutlich wurde durch die gesteigerte Enzymaktivität der Aconitase in *P. vulgaris* pG106_p2499_Aconitase jedoch mehr Citrat zu Isocitrat umgewandelt, welches folglich der Isocitrat-Dehydrogenase zur Verfügung stand. Die Isocitrat-Dehydrogenase katalysierte schließlich die Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat, gekoppelt mit der Freisetzung von CO₂ und [H] in Form

von NADH. Möglicherweise gewährleistete die zusätzliche Bildung von [H] die Versorgung von [H] für die Bildung von Succinat durch den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus. Im selbigen Abschnitt wird für die Umwandlung von PEP zu Oxalacetat CO_2 benötigt, weshalb die zusätzliche Freisetzung von CO_2 ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Bildung von Succinat gehabt haben könnte. Dennoch wäre eine simultane Überproduktion der Citrat-Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase wünschenswert, um die Enzymaktivitäten des grundsätzlich anabolen oxidativen Citratzyklus auf die katabole Aktivitätsebene des reduktiven Citratzyklus angleichen zu können. Zusätzlich könnte eine Überproduktion der limitierenden Enzyme zu einer gesteigerten Succinat-Produktion über den oxidativen Abschnitt des Citratzyklus führen. Dadurch, dass beide Abschnitte des Citratzyklus mit der Bildung von Succinat enden und unter der Annahme, dass eine Überproduktion der oxidativen Enzyme den NADH-Bedarf des reduktiven Teils abdeckt, würden beide Abschnitte des Citratzyklus miteinander verbunden werden. Unter diesen Bedingungen würden [H], welche während der Glykolyse und durch den oxidativen Abschnitt des Citratzyklus gebildet werden, über den reduktiven Zweig re-oxidiert, wodurch die Aufrechterhaltung des Redoxhaushalts ermöglicht wird (Baughn und Malamy, 2003). Unter der Annahme, dass es sich ohne jegliche Nebenprodukt-Bildung um einen Homosuccinat Produzenten handelt, könnte rein theoretisch die Succinat-Ausbeute um bis zu 60 % gesteigert werden (Garschagen, 2022).

4.4.2. Homologe Expression der Transketolase des Pentosephosphatwegs aus *P. vulgatus*

Für Spezies der Ordnung *Bacteroidales* ist beschrieben, dass diese komplexe Enzymsysteme für den Abbau pflanzlicher Polysaccharide, wie Cellulose, Hemicellulosen und Pektine, kodieren (Thomas *et al.*, 2011; Flint *et al.*, 2012). Hemicellulosen, als Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand, macht ca. 20-40 % der gesamten Pflanzenbiomasse aus (McKendry, 2002). Die primäre monomere Untereinheit des Heteropolysaccharids Xylan ist D-Xylose (Bastawde, 1992). Für die Verstoffwechslung von Pentosen, wie D-Xylose, nutzen Mikroorganismen in der Regel den Pentosephosphatweg (PPW). Allgemein dient dieser Stoffwechselweg der Umwandlung von Hexosen in Pentosen und neben der Bildung von [H] auch der Bereitstellung glykolytischer Zwischenprodukte, wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fructose-6-Phosphat. Die gebildeten Pentosen Ribulose-5-Phosphat, Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat können als Ausgangssubstanzen für verschiedene Biosynthesewege genutzt werden, unter anderem für Nukleotid- und Aminosäuresynthesen (Stincone *et al.*, 2015). Der PPW wird in den oxidativen und den nicht-oxidativen Abschnitt unterteilt. Im Gegensatz zu anderen Spezies des Phylums Bacteroidota, wie *P. copri*, kodiert *P. vulgatus* alle Enzyme des oxidativen PPW, im Zuge

dessen [H] gebildet werden (Franke, 2020; Garschagen, 2022). Generell wird für die Verstoffwechslung von Xylose diese zunächst durch einen Xylose-Protonen-Symporter (BVU_0751) in die Zelle aufgenommen. Anschließend folgt die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose, katalysiert durch die Xylose-Isomerase (BVU_3953). D-Xylulose wird durch die Xylosekinase (BVU_3954) zu Xylulose-5-Phosphat phosphoryliert und in den PPW eingeschleust.

Der detaillierte Ablauf dieses Stoffwechselwegs wird im Folgenden beschrieben: Bei der Umsetzung von Glucose wird diese zunächst in Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Im oxidativen Zweig des PPW wird zunächst G6P zu 6-Phosphogluconat (6PG) umgewandelt. Katalysiert wird diese Reaktion durch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH; BVU-2796). Somit wird durch dieses Enzym der G6P-Fluss bestimmt, der in den Stoffwechsel geleitet wird (Ge *et al.*, 2020). Im nächsten Schritt wird unter der Freisetzung von CO₂ 6-Phosphogluconat (6PG) durch die 6PGDH zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) verstoffwechselt. Beide Reaktionen sind irreversibel und NAD(P)⁺ abhängig, sodass schlussendlich NAD(P)H gebildet wird (Abb. 61). Die beiden zentralen Schlüsselenzyme des nicht-oxidativen Zweiges sind die Transketolase (BVU_2318) und die Transaldolase (BVU_3333). Beide Enzyme sind für die reversible Umformung von C₃-, C₅- und C₆-Körpern essenziell (Horecker *et al.*, 1954). Zunächst katalysieren die Ribose-5-Phosphat (R5P)-Isomerase (BVU_2317) und die Ribulose-Phosphat-3-Epimerase (BVU_0050) die reversible Umwandlung von Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) zu Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat (Xu5P). Die Transketolase nutzt Xu5P als Ketosedonor und R5P oder Erythrose-4-Phosphat (E4P) als Aldoseakzeptor zur Generierung von GAP und Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) oder GAP und F6P (Stincone *et al.*, 2015). Somit katalysiert die Transketolase den Transfer von C₂-Einheiten und leitet den Kohlenstofffluss zwischen dem nicht-oxidativen PPW und der Glykolyse bzw. Gluconeogenese in beide Richtungen (Stincone *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2020). Die Transaldolase katalysiert hingegen den reversiblen Transfer von C₃-Einheiten, sodass bei dessen Übertragung von S7P auf GAP E4P und F6P entstehen (Abb. 61). Bei Bedarf werden die glykolytischen Zwischenprodukte GAP und F6P in den EMP-Weg eingespeist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass F6P mittels einer G6P-Isomerase in G6P umzuwandeln wird, welches wieder in den oxidativen Zweig des PPW eingespeist werden kann, um in Folge dessen zusätzliche [H] zu generieren (Abb. 61). Auf diese Weise kann Glucose theoretisch vollständig zu CO₂ und [H] oxidiert werden, wenn der Kreislauf sechs-mal durchlaufen wird. Dabei entstehen 12 Moleküle NAD(P)H.

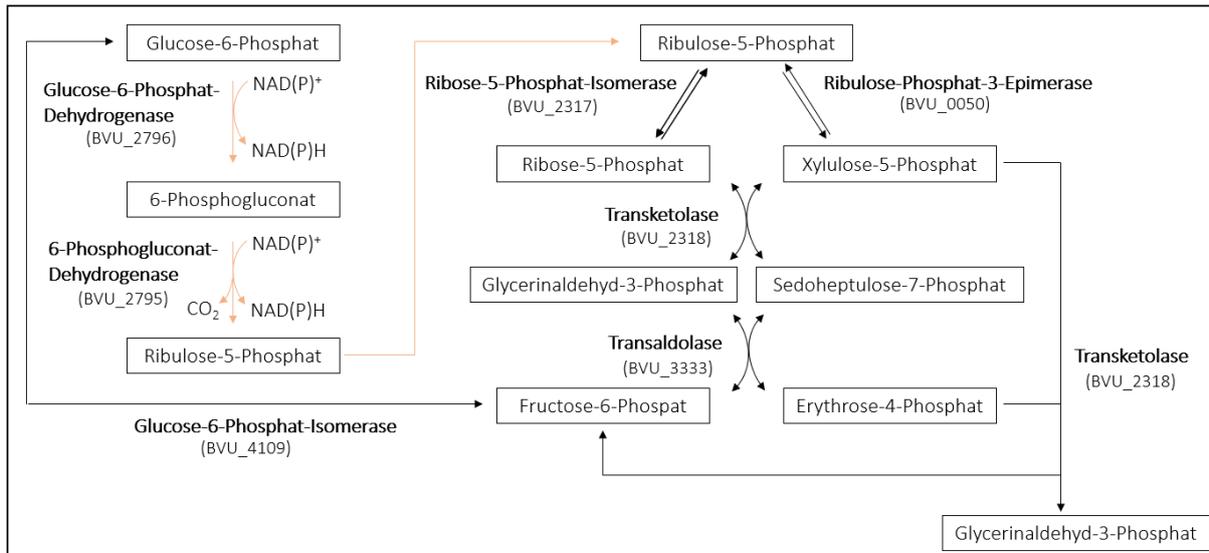


Abbildung 61: Schematische Darstellung des Pentosephosphatwegs in *P. vulgatus*. Der oxidative Teil ist durch orange Pfeile und der reduktive Teil durch schwarze Pfeile dargestellt.

In dieser Arbeit wurde durch den quantitativen Nachweis der mRNA der Gene des PPW bestätigt, dass alle Gene des oxidativen und nicht-oxidativen Abschnitt des PPW in *P. vulgatus* exprimiert werden (Abb. 26). Dabei zeigte sich, dass die Gene der Transaldolase (*bvu_333*), der G6PDH (*bvu_2976*) und der 6PGDH (*bvu_2975*) eine höhere Transkriptabundanz mit Xylose im Vergleich zu Glucose als Substrat aufzeigten (siehe Kapitel 3.6.2.). Demnach scheinen diese Enzyme für die Verstoffwechslung von C5-Zuckern eine zentrale Rolle zu spielen. Wie bereits erwähnt, katalysiert die Transaldolase als Schlüsselenzym des nicht-oxidativen PPW, die reversible Umwandlung von GAP und S7P zu E4P und F6P. Bei Bedarf kann F6P in die Glykolyse geschleust werden, sodass die Transaldolase einen Ankerpunkt zwischen der Glykolyse und dem PPW darstellt (Stincone *et al.*, 2015). Weiterhin kann F6P durch die Isomerisierung zu G6P in den oxidativen Abschnitt geschleust werden, wo G6P durch die zentralen Enzyme G6PDH und 6PGDH irreversibel zu Ru5P, CO₂ und NADH/NADPH umgewandelt wird. Das Transkript-Level der G6PDH und 6PGDH während des Wachstums auf DMMX/PYX deutet darauf hin, dass mit Xylose als Substrat der oxidative Zweig des PPW für die Generierung von [H] verstärkt exprimiert wird. Da durch die Aktivität der Transaldolase das Ausgangssubstrat F6P aus dem nicht-oxidativen Abschnitt für den oxidativen Abschnitt des PPW bereitgestellt wird, untermauert die erhöhte Transkriptmenge der Transaldolase in diesem Zusammenhang die zentrale Ankerrolle dieses Enzyms während der Verstoffwechslung von Pentosen über den PPW. Ebenso wird durch den Unterschied der Transkriptabundanz der Transaldolase mit Glucose und Xylose als Substrat die Funktion des PPW für anabole Prozesse deutlich. Im Vergleich zu Xylose, wurde mit Glucose als Substrat auf Minimalmedium das kodierende Gen der Transaldolase nur 0,15-mal mehr transkribiert. Somit scheint der PPW bei Wachstum mit Glucose eher anabole Funktionen zu übernehmen.

Wie bereits erwähnt, werden im oxidativen Abschnitt des PPW [H] durch die Enzyme G6PDH und 6PGDH generiert. Da für die Bildung von Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus Reduktionsäquivalente in Form von NADH benötigt werden, wurde in dieser Arbeit die Coenzym-Spezifität der entsprechenden Schlüsselenzyme gegenüber $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ untersucht. In den meisten Organismen sind die G6PDH und 6PGDH hoch-spezifisch für NADP^+ (Adachi *et al.*, 1979; Tonouchi *et al.*, 2003). Für *P. vulgatus* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Enzyme eine doppelte Coenzym-Spezifität für NAD^+ und NADP^+ aufwiesen. Dabei war die Aktivität der G6PDH mit NADP^+ um das 60-fache erhöht im Vergleich zu NAD^+ . Im Gegensatz dazu entsprach die Aktivität der 6PGDH mit NADP^+ als Coenzym nur 3 % der Aktivität, welche mit NAD^+ als Coenzym nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.6.3.). Demnach werden durch den oxidativen Abschnitt des PPW in *P. vulgatus* [H] in Form von NADH und NADPH gebildet. In der Literatur ist beschrieben, dass die G6PDH aus *Acetobacter hansenii* (Ragunathan *et al.*, 1994), *Acetobacter vinelandii* (Anderson und Anderson, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Ma *et al.*, 1998) und *Gluconobacter oxydans* (Tonouchi *et al.*, 2003; Rauch *et al.*, 2010) ebenfalls NAD^+ und NADP^+ reduziert. Auch für die 6PGDH aus *Bacillus stearothermophilus* (Veronese *et al.*, 1982) und *Pseudomonas fluorescens* (Stournaras *et al.*, 1982) konnte eine doppelte Coenzym-Spezifität für $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ nachgewiesen werden. Wie auch in *P. vulgatus*, sind für beide Schlüsselenzyme der entsprechenden Organismen unterschiedliche Affinitäten gegenüber $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ beschrieben. Beispielsweise konnte für die G6PDH aus *G. oxydans* mit NAD^+ als Coenzym nur 50 % der Aktivität im Vergleich zu NADP^+ nachgewiesen werden. Die Aktivität der 6PGDH hingegen war mit NAD^+ als Coenzym höher (Tonouchi *et al.*, 2003; Rauch *et al.*, 2010). Wie bereits in Kapitel 3.6.3. erwähnt, wird die Umwandlung von NADPH zu NADH durch eine Transhydrogenase katalysiert (Jackson *et al.*, 1999). Anhand bioinformatischer BLAST-Analysen konnte jedoch kein Gen, welches für eine Transhydrogenase in *P. vulgatus* kodiert, identifiziert werden. Demnach wird NADH im oxidativen Abschnitt des PPW wohlmöglich nur über die 6PGDH gebildet, wohingegen die G6PDH NADPH generiert. Das gebildete NADPH steht anabolen Stoffwechselprozessen, wie der Synthese von Fettsäuren, zur Verfügung, bei dessen zyklischem Prozess insgesamt 2 NADPH pro CO_2 Einheit benötigt werden (Dowhan *et al.*, 2016). Eine mögliche Alternative für eine Transhydrogenase, um NADPH in NADH umzuwandeln, wäre der Ablauf einer zyklischen Reaktionskopplung, bei welcher zunächst Pyruvat zu Lactat unter Oxidation von NADPH umgewandelt wird. In einer zweiten Reaktion entsteht Pyruvat aus Lactat unter Generierung von NADH. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Alkohol-Dehydrogenase, welche zunächst die Reduktion von Ketonen/Aldehyden zu Alkoholen unter Verbrauch von NADPH katalysiert und schließlich die Oxidation von Alkoholen unter Generierung von NADH (Spaans *et al.*, 2015; Sellés *et al.*, 2018). Trotz fehlender Transhydrogenase könnte so das im

oxidativen PPW gebildete NADPH in NADH umgewandelt werden, welches schlussendlich der anaeroben Atmungskette und der Bildung von Succinat zur Verfügung stünde.

Da Fumarat-Atmer keinen geschlossenen Citratzyklus haben, wird der zelluläre Bedarf an [H] über glykolytische Prozesse wie dem EMP-Weg, dem oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatwegs und der unvollständigen Oxidation von Pyruvat zu letztendlich Acetat gewährleistet. Da für die Bildung von Succinat durch den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus [H] benötigt werden, ist eine Erhöhung der intrazellulären NADH-Verfügbarkeit für die Steigerung der Gesamtausbeute von Succinat vielversprechend. In *E. coli* führte die Überproduktion der Transketolase aus dem nicht-oxidativen Abschnitt des PPW zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute von 13 % (Zhu *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des Transketolase kodierenden Gens *bvu_2318* aus dem nicht-oxidativen Abschnitt des PPW zunächst zu einer etwa 30-fachen Steigerung der Transkriptabundanz im Vergleich zum Wildtyp führte (Abb. 30 B). Dabei konnte ebenso eine Auswirkung auf die Transkript-Level der Gene der Transaldolase, RP5-Epimerase und G6P-Isomerase beobachtet werden (Abb. 30 A). Die Transkriptmenge der Transaldolase war im Vergleich zum Wildtyp 3-mal höher, was die zentrale Rolle des Enzyms bei der Verstoffwechslung von Pentosen erneut untermauert. Im Zusammenspiel mit einer gesteigerten Aktivität der G6P-Isomerase wurden vermehrt Stoffwechselintermediate in den oxidativen Abschnitt des PPW geleitet, was zu einer erhöhten Bereitstellung von [H] führte. Folglich standen diese der Bildung von Succinat durch den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus zur Verfügung, was zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute von 35 % führte (Abb. 32). Durch die erhöhte Transkriptmenge der R5P-Epimerase und der damit einhergehenden Steigerung der Proteinsynthese des entsprechenden Enzyms wurde mehr Xu5P gebildet, welches wiederum der Transketolase als Substrat zur Verfügung stand. Demnach spiegeln die Unterschiede der Transkriptabundanzen zwischen *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_p2499_tkt die Zusammenhänge des oxidativen und nicht-oxidativen Abschnitts des PPW, sowie die zentrale Rolle der entsprechenden Enzyme bei der Verstoffwechslung von Pentosen im Hinblick auf die indirekte Bildung von Succinat, wider. Die Transkriptabundanzen der Gene des oxidativen PPW der Mutante waren auf einem zum Wildtyp vergleichbaren Level. Auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat konnte beim Wildtyp beobachtet werden, dass beide Gene des oxidativen Abschnitts im Vergleich zu den übrigen Genen des PPW die höchsten Transkript-Level aufzeigten (Abb. 26 A). Demnach scheinen die G6PDH und 6PGDH keinen limitierenden Einfluss auf die indirekte Bildung von Succinat durch eine erhöhte Bereitstellung von [H] zu haben. Anhand dessen würde eine Überproduktion beider Enzyme vermutlich nicht zu einer Steigerung der Produktion von Succinat führen. Für *M. succiniciproducens* wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass die Überexpression des G6PDH kodierenden Gens (*zwf*) nicht zu einer erhöhten Succinat-Produktion beitrug (Kim *et al.*, 2017).

Wie bereits erwähnt führte in *E. coli* die Überproduktion der Transketolase zu einer Steigerung der Ausbeute von 13 % (Zhu *et al.*, 2013). Durch die zusätzliche homologe Überexpression einer Transhydrogenase (*sthA*) konnte die Ausbeute um weitere 6 % erhöht werden. In Bezug dazu, führte in *P. vulgaris* die Überexpression der Transketoalse bereits zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute um 35 %, welche durch eine heterologe Expression eines Transhydrogenase-Gens nochmals gesteigert werden könnte. Dadurch würden [H] in Form von NADPH, welche für anabole Prozesse durch die G6PDH gebildet werden, durch die Überproduktion einer Transhydrogenase zu NADH umgewandelt werden. NADH würde folglich katabolen Prozessen, wie der Bildung von Succinat, zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil neben der gesteigerten Bereitstellung von [H] ist die Freisetzung von CO₂ im oxidativen Abschnitt des PPW. Dies wird durch die Umsetzung von 6PG zu Ri5P durch die 6PGDH katalysiert. Im zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgaris* wird CO₂ für die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat genutzt, welches im weiteren Verlauf zu Fumarat reduziert wird. Fumarat wird als terminaler Elektronenakzeptor der anaeroben Fumarat-Atmung schließlich zu Succinat reduziert. Durch die Überproduktion der Transketolase wurde vermehrt Kohlenstoff in den oxidativen Abschnitt des PPW geleitet, sodass die Bildung von NADH und die Freisetzung von CO₂ durch die 6PGDH die Bildung von Succinat begünstigte.

Zusammenfassend führte in dieser Arbeit die Überexpression von Genen, welche an [H]-bereitstellenden Stoffwechselwegen beteiligt sind, zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute. Aus industrieller Sicht sind allerdings überwiegend chromosomale Modifikationen relevant, wodurch die Stammerhaltung auch während des Fermentationsprozesses gewährleistet werden kann. Außerdem sind Plasmid-basierte Verfahren überwiegend auf die Anwendung von Selektionsmarkern angewiesen, welche sich industriell ebenfalls nur bedingt einsetzen lassen (Yu *et al.*, 2016). Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden daher genomische Modifikationen durch zielgerichtete Gendeletionen zur Steigerung der Succinat-Ausbeute durchgeführt.

4.5. Erweiterung von Gegenselektionsmarkern für eine zielgerichtete markerlose Gendeletion zur Anwendung in *P. vulgaris*

Für die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften kommensaler Darmbakterien und deren Auswirkung auf die humane Gesundheit, sind funktionelle Studien entsprechender Organismen von entscheidender Bedeutung. Allerdings stellen spezifische Kultivierungsbedingungen und der Mangel genetischer Werkzeuge eine Hürde in der Untersuchung von Darmbakterien dar (Guo *et al.*, 2019; García-Bayona *et al.*, 2019; Bencivenga-Barry *et al.*, 2020). Obwohl die Familie der *Bacteroidaceae* einen großen Anteil der humanen Darmmikrobiota ausmacht (Wu *et al.*, 1979; Arumugam *et al.*, 2011;

Chen *et al.*, 2017), sind die verfügbaren Werkzeuge zur genetischen Manipulation, vor allem in Bezug auf eine markerlose Gendeletion, eingeschränkt. Die Methode der Gendeletion durch Gegenselektionsmarker-basierende Deletionssysteme, beruht auf einem zweistufigen Prozess. Im ersten Schritt integriert der Deletionsvektor mittels sequenzspezifischer Rekombination in die *up* oder *downstream*-Region der zu deletierenden Gensequenz in dem Genom des Organismus. Im zweiten Schritt erfolgt die Selektion gegen den entsprechenden Gegenselektionsmarker auf dem Vektorrückgrat. Somit ist die Wahl des Gegenselektionsmarker essenziell für ein effektives markerloses Deletionssystem.

Kürzlich wurde ein System beschrieben, das ein Anhydrotetracyclin-induzierbares Promotorsystem in Kombination mit den toxischen Effektoren Bfe1 und Bte1 verwendet, die das Wachstum während der Gegenselektion unterdrücken (Bencivenga-Barry *et al.*, 2020). Die antibakteriellen Effektoren Bfe1 und Bte1 sind Teil des Typ-VI-Sekretionssystems und die Expression der entsprechenden Gene wirkt sich letal auf Spezies der *Bacteroidales* aus (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2016; Wexler *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2017). Die Anwendung dieses Systems wurde bereits für *P. vulgatus* Isolate aus dem menschlichen Darm, sowie für *B. thetaiotaomicron*, beschrieben. Ähnliche Ansätze mit induzierbaren *bfe1*- und *bte1*-Konstrukten wurden verwendet, um spezifische Gendeletionen in verschiedenen *Bacteroides*- und *Parabacteroides*-Stämmen zu erzeugen (García-Bayona *et al.*, 2019). Ein weiterer Gegenselektionsmarker wurde auf der Grundlage eines veränderten Gens implementiert, das für die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (*pheS*) kodiert (Kino *et al.*, 2016). Diese mutierte Variante *pheS** weist eine verringerte Substratselektivität auf, die den Einbau des toxischen Phenylalaninanalogs p-Chlor-Phenylalanin ermöglicht. Weiterhin wurde für *P. dorei* und *B. thetaiotaomicron* eine Methode zur Gegenselektion entwickelt, die auf der Sensitivität gegenüber 5-Fluor-2'-Desoxyuridin (FUdr) beruht (Sakanaka *et al.*, 2018).

Die *sacB*-basierte Gegenselektion ist eine der am häufigsten verwendeten Markersysteme für eine markerlose Gendeletion in gram-negativen Bakterien. Ursprünglich stammt dieses Gen aus *B. subtilis* und codiert eine Levansucrase, welche durch die Hydrolyse von Saccharose die Bildung von Levan katalysiert. Da eine intrazelluläre Akkumulation von Levan einen letalen Effekt auf den Organismus hat, kann *sacB* als Gegenselektionsmarker, unter der Zugabe von Saccharose als Substrat, eingesetzt werden. Allerdings wurde für *B. fragilis* gezeigt, dass die Expression von *sacB* keinen letalen Effekt in Anwesenheit von Saccharose bewirkte, weshalb *sacB* für diesen Organismus nicht als Gegenselektionsmarker eingesetzt werden kann (Kino *et al.*, 2016). Dies ist auf das Vorhandensein eines *bt_1760* homologen Gens im Genom des Organismus zurückzuführen. BT1760 kodiert für eine Endolevanase im Genom von *B. thetaiotaomicron*, welches die Spaltung des durch SacB gebildeten

polymeren Levans katalysiert (Mardo *et al.*, 2017). Basierend auf bioinformatischen Analysen konnte gezeigt werden, dass entsprechend homologe Gene in Spezies der Gattung *Phocaeicola* jedoch nicht kodiert werden, wodurch *sacB* als Gegenselektionsmarker für *P. vulgatus* eingesetzt werden kann. In einer Vielzahl von *Bacteroides*-Arten konnten hingegen *bt_1760* homologe Gene identifiziert werden (Neff *et al.*, 2023). Folglich ist in diesen Stämmen das *sacB*-basierte System nicht anwendbar, sodass für eine markerlose Deletion von Genen auf den Einsatz andere Gegenselektionsmarker zurückgegriffen werden muss.

Bekannte Beispiele von Genen, welche in Deletionssystemen vieler Bakterien verwendet werden und auf der Sensitivität gegenüber eines Fluor-haltigen Substrats beruhen, sind *pyrE/ura5*, *hprT*, *pyrE/ura3* und *upp*. Das erste Gen kodiert für eine Oratathphosphoribosyltransferase und *hprT* für eine Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase. Eine Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase wird von *pyrE/ura3* kodiert und eine Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase) von dem Gen *upp* (Boeke *et al.* 1984; Boeke *et al.* 1987; Peck *et al.* 2000; Fabret *et al.* 2002; Bitan-Banin *et al.* 2003; Pritchett *et al.* 2004; Kristich *et al.* 2005; Peters *et al.*, 2012). Das allgemeine Prinzip dieser Gegenselektionsmarker ist die enzymatische Umwandlung von Purin- oder Pyrimidin-Analoga in Produkte, welche eine toxische Wirkung auf die Zellen haben. Organismen, denen das betreffende Enzym fehlt, sind resistent gegenüber diesem toxischen Analogon. Eine Plasmid-kodierte Kopie des entsprechenden Gens kann somit als Gegenselektionsmarker eingesetzt werden.

In dieser Arbeit sollte ein auf dem *upp*-Gen basiertes Deletionssystem für die Anwendung in *Bacteroidales*-Spezies etabliert werden. Die *upp* kodierte UPRTase katalysiert nicht nur die Reaktion von Uracil zu UMP (Martinussen und Hammer, 1994), sondern wandelt auch das toxische Uracil-Analogon 5-FU in 5-UMP um. 5-UMP reagiert zu 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat, einem irreversiblen Inhibitor der Thymidylat-Synthase, was zu einer Hemmung der DNA-Reparatur und -Replikation führt (Neuhard, 1982). Unter Verwendung von *sacB* als Gegenselektionsmarker wurde zunächst das *upp* Gen aus *P. vulgatus* (*bvu_0984*) deletiert, um einen Stamm zu generieren, auf dessen Grundlage *upp* als zukünftiger Gegenselektionsmarker genutzt werden könnte. Allerdings zeigte sich, dass trotz der Deletion von *bvu_0984* die Zugabe von 5-FU einen letalen Effekt auf den Organismus hatte (Abb. 38). Im Genom von *P. vulgatus* wird neben dem *upp* Gen ein weiteres Gen kodiert, welches durch einen zweistufigen Prozess an der Umwandlung von Uracil zu UMP beteiligt ist. Die *bvu_3649* kodierte Purin-Nukleosid-Phosphorylase (BVU_3649) katalysiert natürlicherweise die Reaktion von Uracil zu Uridin, welches anschließend durch eine Uridin-Kinase (BVU_1442, BVU_2358) unter ATP-Verbrauch in UMP umgewandelt wird. Durch die Zugabe von 5-FU wurde dieses somit zunächst zu 5-Flour-Uridin und anschließend zu 5-Flour-UMP umgewandelt, was schlussendlich zur Hemmung der

Thymidylat-Synthase führte und sich daher toxisch auf *P. vulgatus* $\Delta 0984$ auswirkte. Durch die zusätzliche Deletion von *bvu_3649* in *P. vulgatus* $\Delta 0984$ hingegen wurde 5-FU nicht weiter verstoffwechselt, sodass kein toxisches 5-FU in den *salvage-pathway* der Nukleotidsynthese eingeleitet wurde, keine Inhibierung der Thymidylat-Synthase erfolgte und somit das Wachstum von *P. vulgatus* $\Delta 0984$ $\Delta 3649$ nicht inhibiert wurde (Abb. 41 B). Ausgehend von Uracil war es somit *P. vulgatus* $\Delta 0984$ $\Delta 3649$ nicht mehr möglich, UMP, als wichtiges Intermediat der Pyrimidinbiosynthese, zu bilden. Dennoch wies *P. vulgatus* $\Delta 0984$ $\Delta 3649$ keine Auxotrophie gegenüber UMP auf, da der Organismus auch ohne den Zusatz von UMP in der Lage war diese essenzielle Substanz selbst zu synthetisieren. Unter Betrachtung des Stoffwechsels der *de-novo*-Synthese von Pyrimidin wird UMP auf natürliche Weise nicht ausgehend von Uracil, sondern von Glutamin und Carbamoylphosphat gebildet (Abb. 62). Hydrogencarbonat und Ammoniak bilden hierbei die Ausgangsstoffe, die unter Aufwendung von zwei Molekülen ATP zu Carbamoylphosphat umgesetzt werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Carbamoylphosphat-Synthase (BVU_3997-3998). Die Aminogruppe stammt hierbei aus Glutamin. Anschließend werden Carbamoylphosphat und Aspartat zu Carbamoylaspartat, katalysiert durch eine Aspartat-Transcarbamoylase (BVU_3337-3338), umgewandelt. Daraufhin katalysiert eine Dihydroorotase (BVU_2257) die Kondensation zu Dihydroorotat, welches durch eine Dihydroorotat-Dehydrogenase (BVU_3309-10) zu Orotat oxidiert wird. Diese Reaktion ist gekoppelt mit der Reduktion von NAD^+ zu NADH. Anschließend erfolgt die Übertragung von Orotat auf Phosphoribosylpyrophosphat durch eine Orotat-Phosphoribosyltransferase (BVU_0860). Dabei wird der Pyrimidinring von Orotat über eine N-glykosydische Bindung mit Phosphoribosylpyrophosphat verknüpft, sodass unter der Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i) Orotidinmonophosphat entsteht. Eine Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase (BVU_0095) katalysiert schließlich die Decarboxylierung von Orotidinmonophosphat, was zur Bildung von UMP führt (Abb. 62) (Jones, 1980) und als Vorstufe aller anderen Pyrimidin-Nukleotide dient. Somit trat durch die *de-novo*-Synthese keine UMP-Auxotrophie auf.

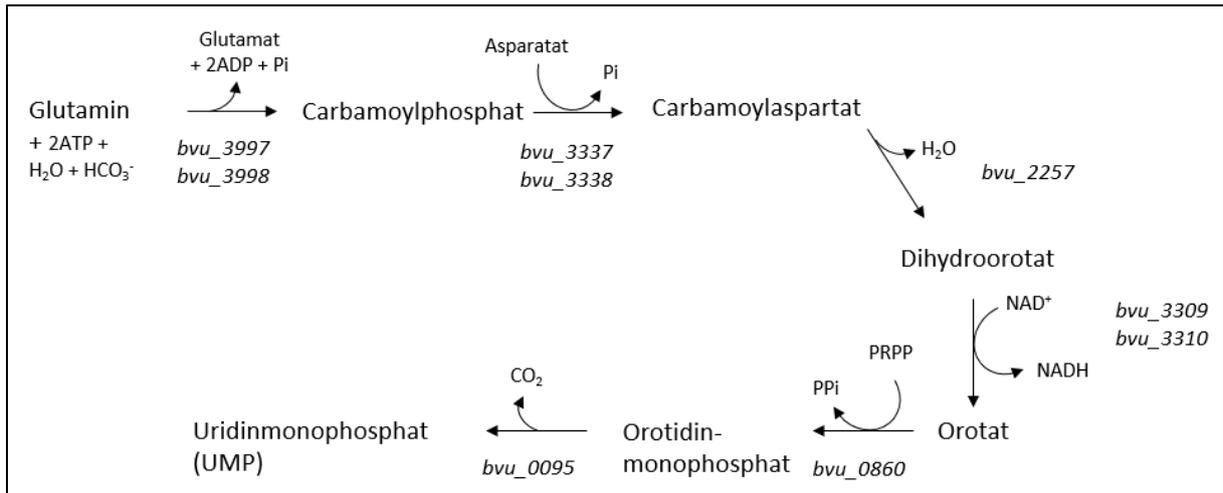


Abbildung 62: De-novo-Syntheseweg von UMP ausgehend von Glutamin und Carbamoylphosphat.

Zusammengefasst wurde durch das Ausschalten der Enzyme UPRTase und Purin-Nukleosid-Phosphorylase die Anwendung eines weiteren Deletionssystems auf der Basis der Gene *bvu_0984* und *bvu_3649* als Gegenselektionsmarker ermöglicht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses System für eine markerlose Deletion von Genen in *P. vulgatus* angewendet werden kann. Durch die Verwendung von *bvu_0984* und *bvu_3649* als Gegenselektionsmarker und der Selektion mit 5-FU konnte in *P. vulgatus* eine markerlose Deletion des Gens *bvu_1663*, welches für eine Levanase kodiert, erzielt werden (Neff *et al.*, 2023). Neben *P. vulgatus*, ermöglicht dieses System ebenfalls den Einsatz in *Bacteroidales*-Stämmen, bei denen die Anwendung von *sacB* als Gegenselektionsmarker aufgrund eines zu *bt_1760* homologen Gens im Genom der Organismen nicht möglich ist. Somit bietet dieses System, nach der Entfernung der Gene *bvu_0984* und *bvu_3649*, eine zusätzliche Möglichkeit für eine zielgerichtete und markerlose Deletion von Genen in *P. vulgatus* und verwandten Arten.

4.6. Markerlose Deletion von Genen aus dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* zur Steigerung der Succinat-Produktion

Bei *P. vulgatus* beruht die grundsätzliche Bildung von Succinat auf dem reduktiven Teil des Citratzyklus. Hierbei wird zunächst Oxalacetat durch die Carboxylierung von PEP und unter Generierung von ATP gebildet. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine PEP-Carboxykinase (BVU_0984). Oxalacetat wird durch die Malat-Dehydrogenase (BVU_0462) weiter zu Malat reduziert, welches durch die Aktivität der Fumarase (BVU_1859) in Fumarat umgewandelt wird. Schlussendlich dient Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor und wird durch eine membranständige Fumarat-Reduktase (BVU_1239-1241) zu Succinat reduziert. Bei CO₂ Mangel wird Succinat weiter zu Propionat verstoffwechselt.

Im fermentativen Zweig des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* ist Pyruvat die Ausgangsverbindung für die Bildung der Stoffwechselendprodukte Lactat, Formiat und Acetat. Pyruvat selbst wird ausgehend von PEP durch die Pyruvat-Kinase (BVU_0867) unter Bildung von ATP gebildet. Neben der Synthese von Lactat durch die D-LDH (BVU_2449) kann Pyruvat über die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL; BVU_2880) oder die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787) verstoffwechselt werden. Die Bildung von Acetyl-CoA über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase erzeugt [H] in Form von Fd_{red} und führt zur Freisetzung von CO_2 . Durch die Aktivität der Phosphotransacetylase (BVU_0523) und der Acetat-Kinase (BVU_0524) wird Acetyl-CoA zu Acetat umgewandelt, was mit einer äquimolaren Bildung von ATP einhergeht.

Damit *P. vulgatus* als biotechnologischer Bio-Succinat-Produzent wettbewerbsfähig eingesetzt werden kann, sind genetische Modifikationen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus zur Optimierung der Produktausbeute notwendig. Das generelle Ziel der genetischen Veränderung zur Erhöhung des Succinat-Ertrags ist es den Kohlenstofffluss in Richtung Succinat-Bildung zu verschieben. Durch die Unterbindung konkurrierender Nebenprodukte wird hierbei nicht nur die Ausbeute von Succinat gesteigert, sondern auch die Konzentrationen von Nebenprodukten minimiert, was den Aufreinigungsprozess von Succinat als gewünschtes Produkt erleichtert und die Kosten senkt (Mancini *et al.*, 2019). Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, führt die Fermentation industriell eingesetzter Succinat-Produktionsstämme zu einem Gemisch an Stoffwechselendprodukten und somit nicht zur Bildung von reinem Succinat. Aus industrieller Sicht wäre jedoch ein Produktionsstamm von Bio-Succinat ideal, welcher aus nachwachsenden Rohstoffen, wie Hemicellulosen, ausschließlich Succinat ohne jegliche Nebenprodukte bilden würde. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit markerlose Deletionen von Genen des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. vulgatus* hinsichtlich der Bildung von Succinat durchgeführt.

4.6.1. Ausschaltung des Propionat-Stoffwechsels in *P. vulgatus*

Im reduktiven Zweig des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* wird Succinat unter CO_2 Mangel in mehreren Schritten weiter zu Propionat verstoffwechselt. Dabei überträgt zunächst eine CoA-Transferase (BVU_1163) einen CoA-Rest auf Succinat, was zur Bildung von Succinyl-CoA führt, gefolgt von einer Umlagerungsreaktion zu (R)-Methylmalonyl (MM)-CoA durch eine MM-CoA-Mutase (BVU_0309-10). Anschließend katalysiert eine MM-CoA-Epimerase (BVU_2492) die Konfigurationsänderung von (R)-MM-CoA zu (S)-MM-CoA, welches anschließend durch eine MM-CoA-Decarboxylase (BVU_1465, BVU_2491, BVU_3102) zu Propionyl-CoA decarboxyliert wird. Die Übertragung des CoA-Rests von Propionyl-CoA auf Succinat durch die CoA-Transferase führt schließlich

zur Bildung von Propionat. Wie bereits in Kapitel 3.7.2. beschrieben, wäre für die Unterbindung des Propionat-Stoffwechsels grundsätzlich die Deletion des ersten Gens (*bvu_1163*) dieses Stoffwechselwegs offensichtlich gewesen. Da das entsprechende Enzym Succinyl-CoA-Transferase jedoch eine essenzielle Rolle im nicht-geschlossenen Citratzyklus von *P. vulgatus* übernimmt, war die Deletion von *bvu_1163* ausgeschlossen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das für die MM-CoA-Mutase kodierende Operon *bvu_0309-10* aus dem Genom von *P. vulgatus* deletiert, um zu verhindern, dass Succinat weiter zu Propionat verstoffwechselt wird. Die Deletion der beiden Gene hatte zur Folge, dass nachweislich kein Propionat mehr von *P. vulgatus* Δ 0309-10 gebildet und somit durch die Deletion der MM-CoA-Mutase der Propionat-Syntheseweg ausgeschaltet wurde. Weiterhin zeigte sich, dass durch das Verhindern der weiteren Verstoffwechslung von Succinat, dieses bei der Deletionsmutante vermehrt im Medium akkumulierte (Abb. 43 B) und im Vergleich zum Wildtyp zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute um 95 % führte (Abb. 45). Obwohl das erste Enzym des Propionat-Stoffwechsels, die CoA-Transferase (*BVU_1163*), weiterhin im Genom des Organismus kodiert vorlag, wurde Succinat durch die Deletion der MM-CoA-Mutase somit scheinbar nicht weiter in das Stoffwechsel-Intermediat Succinyl-CoA umgewandelt. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass potentiell gebildetes Succinyl-CoA im oxidativen Abschnitt des Citratzyklus ebenfalls durch *BVU_1163* zu Succinat umgewandelt werden könnte. Eine Unterscheidung welcher Stoffwechselweg letztendlich zur Bildung von Succinat führte ist durch eine HPLC-Analyse nicht möglich.

Wie bereits in Kapitel 3.7.2. beschrieben, wäre zu erwarten gewesen, dass die gebildeten Mengen an Succinat und Propionat durch den Wildtyp, der durch die Deletionsmutante gebildeten Menge an Succinat, entspricht. Interessanterweise bildete *P. vulgatus* durch die Deletion der MM-CoA-Mutase und somit durch das Ausschalten des Propionat-Stoffwechsels dennoch 23 % mehr Succinat als der Wildtypstamm Succinat und Propionat zusammen (Abb. 45 B). Ausgehend von Succinat ist der Stoffwechselweg zur Bildung von Propionat ein wichtiger Bestandteil für den Energiehaushalt der Zelle. Durch die Decarboxylierungsreaktion von MM-CoA zu Propionyl-CoA durch die MM-CoA-Decarboxylase wird neben der Freisetzung von CO₂ zusätzlich ein Na⁺-Ionengradient erzeugt (Hilpert und Dimroth, 1982). Somit koppelt die membrangebundene MM-CoA-Decarboxylase die exergone Decarboxylierung mit einem Ionentransport über die Membran (De Vries *et al.*, 1977; Galivan und Allen, 1967). Es wird vermutet, dass dieser Ionenfluss einen Betrag zur Energiekonservierung leistet (Hilpert *et al.*, 1983). Die Unterbindung des Propionat-Synthesewegs und der damit fehlende Na⁺-Ionentransport über die Membran führte somit zu einer Störung des Energiehaushalts von *P. vulgatus* Δ 0309-10, welcher wohlmöglich durch eine gesteigerte Fumarat-Atmung ausgeglichen wurde. Dies

spiegelt sich in der erhöhten Succinat-Menge bei *P. vulgatus* Δ 0309-10 im Vergleich zum Wildtyp wider. Möglicherweise hatte dieser Eingriff in den Energiehaushalt des Organismus auch eine Auswirkung auf die Bildung von Speicherstoffen, wodurch sich der geringere Substratverbrauch bei *P. vulgatus* Δ 0309-10 im Vergleich zum Wildtyp erklären ließe. Es ist bekannt, dass Spezies des Phylums Bacteroidota, *P. vulgatus* eingeschlossen, das Polysaccharid Glykogen, bestehend aus Glucose-Einheiten, als Speicher von Kohlenstoff und Energie einlagern (Anstall, 1968; Lindner *et al.* 1979; Preiss, 1984; Lou *et al.* 1997; Takahashi und Yamada, 2000). Diese Glucosemoleküle sind über α -1,4-glykosidische Verbindungen verknüpft. Ebenso weist das Glykogenmolekül Verzweigungen über α -1,6-glykosidische Bindungen auf (Preiss, 1984). Die Anreicherung von Glykogen erfolgt in der Regel in Gegenwart einer überschüssigen Kohlenstoffquelle mit gleichweise begrenzten Wachstumsbedingungen, wie dem Mangel an Nährstoffen. Steht kein Substrat mehr zur Verfügung, kann der Organismus den akkumulierten Speicherstoff für seinen Erhaltungsstoffwechsel nutzen (Preiss, 1984).

Wie bereits erwähnt wurde durch die Deletion der MM-CoA-Mutase die Freisetzung von CO_2 durch die Decarboxylierungsreaktion der MM-CoA-Decarboxylase verhindert. Die Carboxylierungsreaktion von PEP zu Oxalacetat, katalysiert durch die PEP-Carboxykinase, stellt hierbei eine zentrale Schlüsselreaktion dar (Kröger *et al.*, 1992). Die weiteren Reaktionen der Umwandlung von Oxalacetat dienen der Bildung von Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor, welcher schlussendlich zu Succinat reduziert wird. Die Verbindung wird in das umliegende Medium sekretiert oder unter CO_2 Mangel im *P. vulgatus* Wildtyp weiter zu Propionat verstoffwechselt. Durch die Decarboxylierung von Succinat in diesem Stoffwechselabschnitt kann somit der CO_2 -Verbrauch des respiratorischen Abschnitts wieder ausgeglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass in *P. copri*, welcher die Gene des Propionat-Synthesewegs nicht kodiert, eine externe Zufuhr an $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ für ein effektives Wachstum essenziell ist (Franke und Deppenmeier, 2015). Im Vergleich dazu wurde bei *P. vulgatus* eine deutlich geringere Abhängigkeit an extern zugesetztem $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ zum Erreichen der maximalen Wachstumsrate nachgewiesen (Franke und Deppenmeier, 2015). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass *P. vulgatus* im Zuge der Propionatbildung dazu in der Lage ist das generierte CO_2 freizusetzen (Caspari und Macy, 1983; Reichardt *et al.*, 2014), welches von der PEP-Carboxykinase zur Bildung von Oxalacetat genutzt werden kann und somit final für die Bildung von Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Da *P. copri* die entsprechenden Enzyme zur Propionat-Bildung fehlen, scheint dieser Organismus extern zugeführtes $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ für die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat durch die PEP-Carboxykinase zu benötigen. Durch die Unterbindung der weiteren Verstoffwechslung von Succinat zu Propionat ist der reduktive Abschnitt des Zentralmetabolismus von *P. vulgatus* Δ 0309-10 mit dem von *P. copri* vergleichbar, weshalb sich eine erhöhte Abhängigkeit

der Deletionsmutante gegenüber CO₂ im Vergleich zum *P. vulgatus* Wildtyp vermuten lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Hypothese jedoch nicht weiter untersucht, sodass dies einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Experimente darstellt.

Durch die Komplementierung von *bvu_0309-10* in *P. vulgatus* Δ0309-10 konnte gezeigt werden, dass der Propionat-Stoffwechsel wieder hergestellt und folglich Propionat als Stoffwechselendprodukt von *P. vulgatus* Δ0309-10::*bvu_0309-10nP* wieder gebildet wurde (Abb. 47). Hierbei wäre zu erwarten gewesen, dass die gebildete Menge an Propionat durch die Wiederherstellung des Propionat-Synthesewegs mit der Propionat-Menge des Wildtyps vergleichbar ist. Allerdings stellte sich heraus, dass im Vergleich zum Wildtyp die Konzentration gebildeten Propionats reduziert war. Die gebildete Menge an Succinat hingegen war mit derer von *P. vulgatus* Δ0309-10 vergleichbar und lag somit oberhalb der Succinat-Konzentration, welche beim Wildtyp-Stamm detektiert wurde. Folglich führte die Komplementierung des Propionat-Stoffwechsels zu einer Steigerung der Succinat + Propionat Ausbeute im Vergleich zu *P. vulgatus*. Die Gründe hierfür lassen sich nicht auf den ersten Blick erschließen. Es werden weitere Analysen zum Stofffluss erfolgen müssen, um dieses Ergebnis im Detail zu erklären. Durch die geringere Bildung von Propionat wäre es auch für *P. vulgatus* Δ0309-10::*bvu_0309-10nP* interessant in zukünftigen Experimenten die Abhängigkeit gegenüber CO₂ zu untersuchen. Dadurch könnten tiefgründigere Kenntnisse über die Bedeutung dieses Stoffwechselabschnitts und dessen Wichtung in Bezug auf die Energiekonservierung und folglich den Energiehaushalt von *P. vulgatus* erlangt werden.

4.6.2. Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase in *P. vulgatus*

Im Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* kann Pyruvat als zentrale Ausgangsverbindung über die Pyruvat-Formiat-Lyase (BVU_2880) oder die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787) verstoffwechselt werden. Die Bildung von Acetyl-CoA über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase erzeugt [H] in Form von Fd_{red} und führt zur Freisetzung von CO₂, während die Bildung von Formiat über die Pyruvat-Formiat-Lyase keine [H] erzeugt. Somit dient Formiat zur Entfernung von Reduktionsäquivalenten, was einem Überschuss an [H] entgegenwirkt und so die Aufrechterhaltung des Metabolismus gewährleistet. Da für die Synthese von Succinat im Zuge der OAA-Reduktion [H] benötigt werden und durch die Bildung kompetitiver Endprodukte Kohlenstoff verbraucht wird, sollte durch die Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase die Bildung von Formiat unterbunden werden. Folglich würde mehr Kohlenstoff und [H] für den reduktiven Ast des Zentralmetabolismus zur Generierung von Succinat zur Verfügung stehen. Die Deletion von *bvu_2880* in *P. vulgatus* hatte zur Folge, dass kein Formiat mehr gebildet wurde, was anhand der Produktbildung (Abb. 54), als auch auf enzymatischer Ebene (Abb. 53 A) nachgewiesen werden konnte. Somit wurde Pyruvat nur noch durch die

Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgewandelt, was mit einer zusätzlichen Freisetzung von CO₂ und [H] in Form von Fd_{red} gekoppelt ist. Das durch diese Reaktion vermehrt freigesetzte Fd_{red} führte jedoch weder zu einer gesteigerten Succinat-Bildung (Abb. 54), noch zur erhöhten Bildung molekularen Wasserstoffs (Abb. 53 B) durch die im Genom kodierte [FeFe]-Hydrogenase (BVU_0347) im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise wurde das zusätzlich gebildete Fd_{red} für anabolische Prozesse und folglich für den Aufbau von Biomasse eingesetzt. Das durch die Decarboxylierungsreaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase freigesetzte CO₂ könnte jedoch in diesem Zusammenhang einen positiven Effekt auf den CO₂-Bedarf des Zentralstoffwechsels von *P. vulgatus* Δ2880 haben, sodass zukünftige Untersuchungen hinsichtlich der Abhängigkeit von CO₂ im Vergleich zum Wildtyp vielversprechend wären. Letztendlich führte die Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase nicht zu einer gewünschten Steigerung der Succinat-Ausbeute. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass in *A. succinogenes* durch die Deletion der Pyruvat-Formiat-Lyase ebenfalls keine Optimierung des Succinat-Ertrags erreicht werden konnte (Cheng *et al.*, 2013). Dennoch ist aus industrieller Sicht die Unterbindung konkurrierender Stoffwechselendprodukte von zentraler Bedeutung, damit die Herstellung von Succinat durch mikrobielle Fermentation gegenüber der chemischen Synthese konkurrenzfähig ist.

4.6.3. Generierung von *P. vulgatus* Δ0309-10 Δ2449 Δ2880 als optimierter Succinat-Produzent

Durch die Deletion der MM-CoA-Mutase (BVU_0309-10) und somit durch das Ausschalten des Synthesewegs von Propionat in *P. vulgatus* Δ0309-10 konnte die weitere Verstoffwechslung von Succinat unterbunden werden, sodass der reduktive Ast des zentralen Kohlenstoffmetabolismus mit der Bildung von Succinat endete. Dies resultierte in einer signifikanten Steigerung der Succinat-Ausbeute (Kapitel 4.6.1.). Im reduktiven Abschnitt des Citratzyklus wird Succinat durch die Reduktion von Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor durch die membrangebundene Fumarat-Reduktase gebildet. Im Zuge dessen werden durch die entsprechenden Enzymkomplexe der anaeroben Atmungskette [H] in Form von NADH und Fd_{red} verbraucht. Um die Bereitstellung von NADH zu steigern stand die Deletion der D-Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) in *P. vulgatus* Δ0309-10 im Vordergrund, welche durch die Reduktion von Pyruvat und der dadurch gekoppelten Oxidation von NADH zu NAD⁺, die Bildung von Lactat katalysiert. Die Deletion von *bvu_2499* in *P. vulgatus* Δ0309-10 hatte zur Folge, dass neben Propionat im reduktiven Ast des Zentralstoffwechsel, auch kein Lactat im fermentativen Stoffwechselabschnitt des Organismus mehr gebildet wurde. Allerdings führte die Eliminierung der D-Lactat-Dehydrogenase im Vergleich zu *P. vulgatus* Δ0309-10 nicht zu einer signifikanten Steigerung der

Succinat-Ausbeute (Abb. 50 C). Aus industrieller Sicht ist die Unterbindung der Lactat-Bildung dennoch ein positiver Effekt im Hinblick auf die Optimierung eines geeigneten und konkurrenzfähigen Succinat-Produzenten. Unter Betrachtung der Stoffwechselendprodukt-Verhältnisse von *P. vulgatus* Δ 0309-10 Δ 2499 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm wurde deutlich, dass der durch die Unterbindung der Lactat-Bildung zur Verfügung stehende Kohlenstoff in die Synthese der organischen Säuren Formiat und Acetat floss (Abb. 50 A). Somit wurde der Kohlenstoff nicht in Richtung des reduktiven Asts zur Bildung von Succinat gelenkt, sondern ausgehend von Pyruvat zur Bildung anderer Nebenprodukte im fermentativen Abschnitt des Zentralstoffwechsels eingesetzt. Dies spiegelt wider, dass die Bildung von Formiat vermutlich als indirekter *redox sink* zur Aufrechterhaltung des Redoxhaushalts in *P. vulgatus* diene. Der *P. vulgatus* Wildtyp bildet bezogen auf das Mengenverhältnis der Stoffwechselendprodukte nur geringe Konzentrationen an Formiat. Im Vergleich dazu führte die Deletion der D-Lactat-Dehydrogenase in *P. vulgatus* Δ 0309-10 zu einer 2,5-fachen Steigerung der Formiat-Menge, sodass Formiat schlussendlich 11 % der Gesamtmenge an Endprodukten ausmachte. Auf dem weiteren Weg zur Generierung eines Homosuccinat-Produzenten wurde daher im Folgenden die Pyruvat-Formiat-Lyase in *P. vulgatus* Δ 0309-10 Δ 2499 deletiert, sodass neben Propionat und Lactat, auch kein Formiat als Endprodukt mehr gebildet werden sollte. Nachweislich führte die zusätzliche Deletion von *bvu_2880* während der Xylose-Verstoffwechslung nur noch zur Bildung der Produkte Acetat und Succinat (Abb. 57). Allerdings konnte dadurch die Succinat-Ausbeute im Vergleich zu *P. vulgatus* Δ 0309-10 Δ 2499 nicht weiter gesteigert werden. Im Vergleich zum Wildtyp war dennoch die gebildete Menge an Succinat durch *P. vulgatus* Δ 0309-10 Δ 2499 Δ 2880 um das 1,9-fache höher, sodass dieser Organismus aus biotechnologischer Sicht einen vielversprechenden Kandidaten für eine optimierte Succinat-Produktion darstellt. Durch die Eliminierung der konkurrierenden Nebenprodukte Propionat, Lactat und Formiat wird hierbei vor allem der Aufreinigungsprozess von Succinat als gewünschte Plattformchemikalie erleichtert, wodurch Prozesskosten gesenkt werden. Eine mögliche Alternative zur Unterbindung der Formiat-Bildung wäre, Formiat als Endprodukt zu nutzen, indem durch die heterologe Überproduktion einer Formiat-Dehydrogenase zusätzlich [H] in Form von NADH generiert werden würden. Die Formiat-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Formiat zu CO₂, wobei NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Demnach würde durch die heterologe Überproduktion dieses Enzyms Formiat als Endprodukt verbraucht werden und NADH, sowie CO₂ dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus vermehrt zur Verfügung stehen. In *C. glutamicum* beispielsweise führte die heterologe Überproduktion einer Formiat-Dehydrogenase unter dem Zusatz von Formiat zu einer 20 %-igen Steigerung der Succinat-Ausbeute (Litsanov *et al.*, 2012).

Trotz der erhöhten Ausbeute an Succinat durch *P. vulgatus* Δ 0309-10 Δ 2499 Δ 2880 im Vergleich zum Wildtyp ist anzumerken, dass weiterhin Acetat als hauptsächliches Endprodukt gebildet wurde.

Zukünftig wäre es somit von Vorteil die Menge an Acetat im Verhältnis zu derer von Succinat in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2499 \Delta 2880$ zu minimieren. Hierbei bieten sich verschiedene Ansätze an, die Ausbeute von Succinat weiter zu steigern und das Verhältnis der Endproduktkonzentrationen zu verschieben oder sogar gewinnbringend zu nutzen. Entsprechende Möglichkeiten werden im folgenden Abschnitt und in Kapitel 4.7 genauer diskutiert und erläutert.

Unter Betrachtung des Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* spaltet sich dieser ausgehend von PEP in den reduktiven und fermentativen Stoffwechselabschnitt auf, sodass PEP eine zentrale Ausgangsverbindung darstellt. Im fermentativen Ast katalysiert die Pyruvat-Kinase (BVU_0876) die Umwandlung von PEP zu Pyruvat, dessen weitere Oxidation schlussendlich in der Bildung von Acetat endet. Die Deletion der Pyruvat-Kinase und somit die Unterbindung des gesamten fermentativen Ast des Zentralstoffwechsels hätte jedoch vermutlich einen letalen Effekt auf den Organismus, da *P. vulgatus* das über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase produzierte Fd_{red} für den eigenen Anabolismus benötigt. Zusätzlich würde sich das fehlende ATP aus der Reaktion der Acetat-Kinase auch im Energiehaushalt des Organismus bemerkbar machen, sodass dieser Stoffwechselweg vermutlich essenziell für wachsende *P. vulgatus*-Kulturen ist. In der Literatur (Tabelle 22; siehe Kapitel 4.3) ist beschrieben, dass bei *V. natriengens*, *M. succiniciproducens* und *E. coli* durch die Deletion der Lactat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Formiat-Lyase die Ausbeute von Succinat gesteigert werden konnte. Allerdings wurden hierbei zur Optimierung der Succinat-Ausbeute neben der Lactat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Formiat-Lyase auch weitere Gene deletiert, welche zur Unterbindung weiterer Endprodukte (wie Acetat und Ethanol) oder zur Verbesserung der Substrataufnahme beitragen (Lee *et al.*, 2006; Jantama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2013; Thoma *et al.*, 2022). Hervorzuheben ist vor allem die Deletion der Gene *pta* und *ackA*, welche für die Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase kodieren und somit essenziell zur Bildung von Acetat sind. Eine Unterbindung der Acetat-Produktion durch die Deletion der entsprechenden Enzyme würde sich jedoch vermutlich inhibierend auf das Wachstum der dreifachen Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ auswirken, da das Enzym SCACT des oxidativen Teils des Citratzyklus Acetat-abhängig ist. Eine vollständige Unterbindung der Synthese von Acetat lässt sich somit aufgrund der Notwendigkeit für den Gesamtstoffwechsel von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2499 \Delta 2880$ voraussichtlich nicht umsetzen.

Bei den in der Literatur beschriebenen, industriell eingesetzten Succinat-Produzenten existiert kein Produktionsstamm, der Succinat ohne Nebenprodukte bildet. Demnach nehmen viele Produktionssysteme ohnehin die Bildung von Nebenprodukten in Kauf oder nutzen diese unter Umständen sogar gewinnbringend (Mancini *et al.*, 2019). Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz genetisch

optimierterer *S. cerevisiae*-Stämme, welche neben der Bildung von Succinat über den reduktiven und oxidativen Abschnitt des Citratzyklus zusätzlich größere Mengen an Ethanol synthetisieren. Somit dient dieser Stamm neben Succinat auch der Vermarktung von Bioethanol (Mancini *et al.*, 2019; Raab *et al.*, 2010). In Bezug auf die Bildung von Acetat wird *Clostridium ljungdahlii* beispielsweise für den fermentativen Herstellungsprozess von Ethanol und Acetat eingesetzt (Cotter *et al.*, 2009). Möglicherweise könnte somit auch bei *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2499$ $\Delta 2880$ die Bildung von Acetat als Nebenprodukt gewinnbringend genutzt werden.

4.7. Strategien zur Optimierung der Succinat-Produktion in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2449$ $\Delta 2880$

In dieser Arbeit wurden grundlegende Untersuchungen zur Generierung eines Homosuccinat-Produzenten durchgeführt. Im Zuge dessen war vor allem die Deletion von Genen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus*, welche an der Synthese konkurrierender Nebenprodukte beteiligt sind, eine entscheidende Voraussetzung für die Optimierung der Succinat-Produktion. Durch die markerlosen Gendeletionen von *bvu_0309-10* (MM-CoA-Mutase), *bvu_2499* (D-Lactat-Dehydrogenase) und *bvu_2880* (Pyruvat-Formiat-Lyase) konnte die Bildung der Stoffwechselendprodukte Propionat, Lactat und Formiat unterbunden werden, sodass *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2449$ $\Delta 2880$ nur noch Acetat und Succinat als metabolische Endprodukte bildete. Zusätzlich konnte durch diese zielgerichteten genetischen Modifikationen die Succinat-Ausbeute um das 1,9-fache im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden. Um die Synthese von Succinat weiterhin zu verbessern, gibt es verschiedene Ansatzpunkte, welche unter anderem weitere genetische Modifikationen, sowie die Optimierung von Prozessparametern, umfassen.

4.7.1. Optimierung der Succinat-Ausbeute durch die Überexpression von Genen in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2449$ $\Delta 2880$

Im Zuge dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass durch die homologe Expression von Genen in *P. vulgatus*, welche direkt oder indirekt an der Bereitstellung von [H] beteiligt sind, die Synthese von Succinat gesteigert werden konnte (siehe Kapitel 4.4.1. und 4.4.2.). Somit könnte durch die homologe Expression der Gene des oxidativen Citratzyklus (*bvu_1959-1961*) in *P. vulgatus* $\Delta 0309-10$ $\Delta 2449$ $\Delta 2880$ der natürlicherweise anabole oxidative Teil des Citratzyklus mit dem reduktiven Teil verbunden und durch die erhöhte Bereitstellung von [H] möglicherweise die Ausbeute von Succinat gesteigert werden (Abb. 63). In *E. coli* beispielsweise führte eine geringere enzymatische Aktivität der Citrat-

Synthese zu einer erhöhten Menge an Acetat, da das Substrat Acetyl-CoA vermehrt für die Bildung von Acetat im fermentativen Ast des Kohlenstoffmetabolismus eingesetzt wurde (Tovilla-Coutino *et al.*, 2020). Da der Acetyl-CoA-Fluss des Citratzyklus durch die Aktivität der Citrat-Synthase bestimmt wird (Weitzman und Jones, 1968), könnte möglicherweise durch die Überproduktion der Citrat-Synthase in Kombination mit der Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase, die entsprechenden Enzymaktivitäten intrazellulär erhöht und dadurch die Ausbeute an Succinat gesteigert werden. Ebenfalls könnte dadurch vermehrt Acetat durch die SCACT für die Umwandlung von Succinyl-CoA zu Succinat verbraucht werden. Neben der positiven Auswirkung auf die Bereitstellung von [H] und folglich auf die Succinat-Ausbeute hätte dies den Vorteil, dass Acetat für die Wiedereinspeisung in den Citratzyklus abgezogen werden würde und somit in geringeren Mengen als Endprodukt im Medium akkumuliert. Zusätzlich könnte aber auch Acetyl-CoA direkt vermehrt in den Citratzyklus eingespeist werden, was ebenfalls zu einer Minimierung von Acetat als akkumulierendes Endprodukt führen würde. Neben der für die Homosuccinat-Fermentation vermutlich essenziellen Überexpression der Gene des oxidativen Citratzyklus könnte zusätzlich auch die homologe Überexpression des Transketolase-Gens (*bvu_2318*) in *P. vulgaris* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$, durch die indirekt gesteigerte Bereitstellung von [H] durch den oxidativen PPW, zu einer Steigerung der Succinat-Ausbeute führen (Abb. 63).

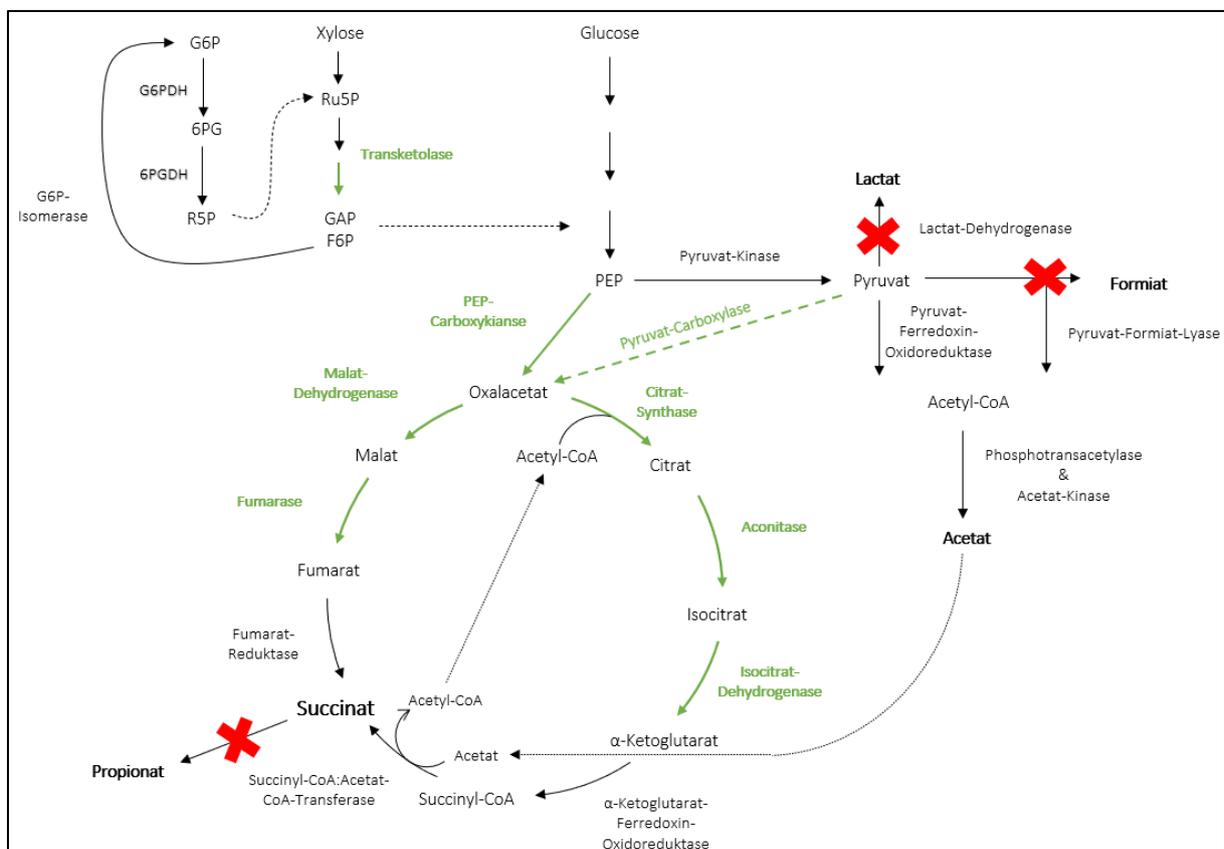


Abbildung 63: Schematische Darstellung des Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgaris* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ mit Strategien der genetischen Manipulation zur Steigerung der Succinat-Produktion. Grüne Pfeile und

Enzymnamen repräsentieren das Ziel der Überexpression. Rote Kreuze symbolisieren die Deletion des entsprechenden Stoffwechselabschnitts. G6P = Glucose-6-Phosphat; 6PG = 6-Phosphogluconat; Ru5P = Ribulose-5-Phosphat; GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat; F6P = Fruktose-6-Phosphat; PEP = Phosphoenolpyruvat; CoA = Coenzym-A.

Weiterhin stellt die homologe Überexpression der PEP-Carboxykinase (BVU_0983) einen vielversprechenden Ansatz dar, um den Kohlenstofffluss gezielt in die Richtung von Oxalacetat und somit zur Bildung von Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus zu lenken (Abb. 63). In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Überexpression dieses Enzyms ein entscheidender Faktor für eine hohe Succinat-Produktion darstellt (Dai *et al.*, 2020). Beispielsweise führte die heterologe Expression der *pck* aus *A. succinogenes* in *E. coli* zu einer 6,5-fachen Steigerung der Ausbeute (Kim *et al.*, 2004). Neben der PEP-Carboxykinase führte auch oftmals die Überproduktion der Malat-Dehydrogenase und Fumarase zu einer Steigerung der Succinat-Produktion (Hong *et al.*, 2004; Guarnieri *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2020). So konnte in *S. succinogenes* durch die homologe Expression des Malat-Dehydrogenase-Gens der Succinat-Ertrag um 12,7 % und durch die homologe Überexpression des Fumarase-Gens um 6 % gesteigert werden (Guarnieri *et al.*, 2017). Im fermentativen Abschnitt des Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ stellt Pyruvat eine zentrale Ausgangsverbindung zur Bildung von Acetat dar. Möglicherweise könnte durch die heterologe Expression eines Pyruvat-Carboxylase-Gens (*pyc*) Pyruvat für die direkte Bildung von Oxalacetat abgezogen werden. Somit würde weniger Pyruvat für die Bildung von Acetat und gleichzeitig mehr Oxalacetat zur Bildung von Succinat zur Verfügung stehen (Abb. 63). In *E. coli* konnte durch die heterologe Expression von *pyc* aus *Rhizobium etli* die Succinat-Ausbeute um 50 % gesteigert werden (Gokarn *et al.*, 1998), was zeitgleich zu einer Senkung der Acetat-Konzentration von 57 % führte (March *et al.*, 2002).

4.7.2. Steigerung der Succinat-Ausbeute durch die Optimierung von Prozessparametern

Neben der zielgerichteten genetischen Manipulation von *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ könnte die Succinat-Ausbeute ebenfalls durch Prozessoptimierungen gesteigert werden. Eine Möglichkeit wäre die Anpassung der Substratkonzentration. Franke (2020) konnte zeigen, dass bei einer Erhöhung von 30 mM auf 200 mM Glucose im Batch-Verfahren, die Konzentration von Succinat um nahezu das fünf-fache gesteigert werden konnte. In Kombination mit einer CaCO₃-Pufferung des Mediums konnten durch die Anpassung der Substratkonzentration bis zu 220 mM Succinat (25 g/l) erzielt werden, was einem Ertrag von 0,7 g Succinat/g Glucose entsprach (Franke 2020). Entsprechend zu den Experimenten von Franke (2020) sollte auch bei *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ das Kulturmedium in zukünftigen Batch- oder Fed-Batch-Fermentationsverfahren mit CaCO₃ gepuffert werden, um den

pH-Wert während der Fermentation stabil zu halten. Weiterhin würde dadurch verhindert werden, dass eine gesteigerte Ansammlung an Endprodukten schlussendlich zur Entkopplung der Atmungskette führt. Die schwachen Säuren (wie Acetat) liegen wegen ihres pKs-Wertes extrazellulär teilweise protoniert vor. Acetat (pKs-Wert von 4,76) ist in seiner undissoziierten Form membranpermeabel, sodass Essigsäure ungehindert die Zellmembran passieren kann und in das Cytoplasma der Zelle gelangt (Russell und Diez-Gonzalez, 1998). Aufgrund des pH-Wertes im cytoplasmatischen Raum kommt es zur Deprotonierung der schwachen Säure. Die Freisetzung von Protonen im intrazellulären Raum sorgt für eine Entkopplung des elektrochemischen Protonengradienten über die bakterielle Zellmembran (Kell *et al.*, 1981). Dies beeinträchtigt den Energiestoffwechsel des Organismus (Axe, 1995), sodass bei einer ausreichenden Konzentration an schwachen Säuren der Stoffwechsel zum Erliegen kommen würde. Durch die puffernde Wirkung von CaCO_3 würden die Protonen der Carboxylgruppe, der im Medium akkumulierenden Endprodukte, auf CaCO_3 übertragen werden. Letztendlich führt dies zur Freisetzung von CO_2 (Salek *et al.*, 2015), was einen positiven Nebeneffekt auf die Produktion von Succinat darstellen würde. Das freigesetzte CO_2 würde der Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat zur Verfügung stehen und somit final für die Bildung von Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor, welcher im Zuge der anaeroben Zellatmung zu Succinat reduziert wird. Der positive Effekt einer erhöhten $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen auf die Aktivität der PEP-Carboxykinase wurde bereits in der Literatur beschrieben. Beispielsweise führte die Zugabe von NaHCO_3 bei einem PEP-Carboxykinase überproduzierenden *E. coli*-Stamm zu einer 2,2-fachen Steigerung des Succinat-Titers (Deok *et al.*, 2006). Auch bei anderen Fumarat-Atmern konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentration einen positiven Effekt auf den respiratorischen Stoffwechselabschnitt der Organismen, im Hinblick auf die Produktion von Succinat hatte (Samuelov *et al.*, 1991; Caspari and Macy, 1983).

Eine zusätzliche Möglichkeit der Akkumulation saurer Endprodukte entgegenzuwirken, wäre ein kontinuierliches Fermentationsverfahren. Durch eine ständige Zufuhr von Substraten und Abfuhr von Endprodukten, würde die Bildung von Biomasse für eine gesteigerte Succinat-Produktion begünstigt werden. Industriell werden kontinuierliche Fermentationsprozesse häufig in Kombination mit integrierten Membransystemen eingesetzt, wodurch ein Zellrecycling gewährleistet wird. Ein solches kontinuierliches Fermentationssystem führte mit *M. succiniciproducens* als Produktionsstamm zu einer außerordentlichen Produktivitätssteigerung (Lee *et al.*, 2016).

Neben den zuvor beschriebenen Strategien ist auch die Wahl des eingesetzten Ausgangsmaterials ein entscheidender Faktor zur Optimierung des Herstellungsprozesses von Bio-Succinat. Wie zuvor beschrieben, ist *P. vulgatus* in der Lage nachwachsende Rohstoffe, wie Hemicellulosen, zu

verstoffwechseln und dadurch Succinat auf natürliche Weise als Endprodukt zu bilden. In früheren Fermentationsansätzen wurde in der Regel Glucose als Kohlenstoffquelle für eine Succinat-Produktion eingesetzt. Neben enormen Produktionskosten steht die Verwendung von Glucose als Wachstumssubstrat jedoch vor allem in Konkurrenz mit der Lebensmittelindustrie. Durch den Einsatz nachwachsender Rohstoffe für eine industriell nachhaltig und biobasierte Succinat-Produktion würden Produktionskosten eingespart und die Bedrohung der Ernährungssicherheit minimiert werden (Cao *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2021). In den letzten Jahren wurden bereits verschiedene lignocellulolytische Substrate für die Herstellung von Bio-Succinat getestet. Dabei konnten vergleichbare Erträge zu anderen Substraten, wie Glucose und Glycerin, erzielt werden. Beispielsweise wurde mit Maisstroh als Substrat und *A. succinogenes* als Produktionsstamm ein Ertrag von 0,74 g Succinat/g Maisstroh erzielt (Salvachúa *et al.*, 2016). *A. succiniciproducens* bildete aus Eichenholz-Hydrolysat (49 % Cellulose, 26 % Hemicellulose, 22 % Lignin) 24 g/l Succinat mit einer Ausbeute von 0,88 g Succinat pro g Eichenholz-Hydrolysat (Lee *et al.*, 2003). Die Fähigkeit, nachwachsende pflanzliche Polysaccharide durch im Genom kodierte hydrolytische Enzymsysteme verstoffwechseln zu können, ist ein nicht zu unterschätzender Mehrwert in Bezug auf eine industrielle Herstellung von Plattformchemikalien. Die meisten Succinat-produzierenden Produktionsstämme sind nicht in der Lage Lignocellulose-haltige Biomasse zu verstoffwechseln, wodurch eine Vorbehandlung des Ausgangsmaterials mit hydrolytischen Enzymen notwendig ist. Eine direkte Umwandlung des Substrats durch den eingesetzten Organismus in einem einstufigen-Prozess ist daher aus industrieller Sicht von großem Vorteil.

Zusammengefasst ermöglichte in dieser Arbeit die Entwicklung genetischer Methoden die Generierung der dreifachen Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$. Durch die Unterbindung der Nebenproduktbildung von Propionat, Lactat und Formiat produziert dieser Organismus nur noch Succinat und Acetat als metabolische Endprodukte, wodurch die Succinat-Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp nahezu verdoppelt werden konnte. Dadurch stellt dieser Organismus einen geeigneten und vielversprechenden Kandidaten für eine biotechnologisch nachhaltige und biobasierte Herstellung von Succinat dar. Zukünftig könnten Strategien, welche zielgerichtete genetische Manipulationen, sowie die Anpassung von Prozessparametern beinhalten, den Succinat-Ertrag weiterhin steigern. Dadurch wäre aus industrieller Sicht die Homosuccinat-Fermentation mit *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ als Produktionsstamm ein neuartiges und zugleich überaus effizientes Verfahren der anaeroben Succinat-Herstellung.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Etablierung eines genetischen Systems zur Anwendung in dem bedeutsamen Darmbakterien *Phocaeicola (P.) vulgatus* im Hinblick auf eine biotechnologisch biobasierte Produktion von Succinat.

Der Umstieg einer traditionell petrochemischen Produktion hin zu einer mikrobiellen Synthese von Bulk-Chemikalien als Fermentationsprodukt nachwachsender Rohstoffe nimmt immer mehr an Bedeutung zu. Im Fokus dessen steht ebenfalls die biobasierte Herstellung von Succinat, als eine der am meisten produzierten Plattformchemikalien weltweit. Da *P. vulgatus* entsprechende Enzymsysteme für den Abbau komplexer, pflanzlicher Polysaccharide besitzt und durch deren Verstoffwechslung große Mengen an Succinat produziert, ist dieser Organismus ein vielversprechender Kandidat für eine nachhaltige Succinat-Produktion. Daher wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Steigerung der Succinat-Ausbeute durch genetische Manipulation des zentralen Kohlenstoffwechsels von *P. vulgatus* durchgeführt.

1. Für eine Modifizierung des Stoffwechsels muss der entsprechende Organismus generell genetisch zugänglich sein, sodass das Einbringen von rekombinanter DNA in die Zelle, sowie die Deletion chromosomaler Gene, umsetzbar ist. Unter Verwendung des *shuttle*-Vektors pG106 und des genomintegrativen Vektors pMM656 konnte zunächst bestätigt werden, dass ein Transfer von Fremd-DNA in *P. vulgatus* grundsätzlich möglich ist. Durch die homologe Überexpression des für die D-Lactat-Dehydrogenase kodierenden Gens *bvu_2499 (ldh)* wurde anschließend überprüft, ob der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* gezielt modifiziert werden kann. Hierfür wurde die *ldh*-Kopienzahl, die Transkriptabundanz, sowie die Enzymaktivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die *shuttle*-Vektor tragende Mutante, *P. vulgatus* pG106_ldhNP, zeigte eine ca. 1500-fache Steigerung der *ldh*-Transkriptmenge und eine 200-fach höhere Enzymaktivität der D-Lactat-Dehydrogenase im Vergleich zum Wildtyp. Schlussendlich führte dies zu einer Verschiebung des Produktspektrums hin zu einer 10-fachen Steigerung der Lactatproduktion. Dadurch wurde die Grundlage für eine genetische Optimierung von *P. vulgatus*, im Hinblick auf eine biotechnologische Anwendung zur Steigerung der Produktion von Plattformchemikalien (wie Succinat), geschaffen.
2. Als anaerober Fumarat-Atmer bildet *P. vulgatus* Succinat natürlicherweise über den reduktiven und oxidativen Abschnitt des nicht-geschlossenen Citratzyklus, wobei die zellulär relevante Succinat-Produktion auf dem reduktiven Teil basiert. Da für die Bildung von Succinat im Zuge der anaeroben Fumarat-Atmung Reduktionsäquivalente ([H]) benötigt werden, wurden in dieser Arbeit Gene überexprimiert, welche an [H]-generierenden Stoffwechselwegen beteiligt sind. Vor

allem der oxidative Teil des Pentosephosphatwegs (PPW) ist für die Bildung von [H] verantwortlich. Daher wurde die Transketolase (BVU_2318), als eines der Schlüsselenzyme des PPW, in *P. vulgatus* homolog überproduziert. Dadurch konnte der Ertrag von Succinat um 35 % gesteigert werden. Neben dem PPW werden auch im oxidativen Abschnitt des Citratzyklus [H] gebildet. Die homologe Überproduktion der Aconitase, welche eine zentrale Rolle dieses Stoffwechselabschnitts übernimmt, resultierte in einer Steigerung der Succinat-Ausbeute um 13 % im Vergleich zum Wildtyp. Durch die Überexpression der kodierenden Gene der Citrat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase konnte die Succinat-Produktion hingegen nicht optimiert werden. Im Konzept der Homosuccinat-Fermentation könnten jedoch künftig durch eine simultane Überproduktion der Enzyme des oxidativen Teils des Citratzyklus beide Abschnitte des nicht-geschlossenen Citratzyklus miteinander verbunden werden. Dadurch könnte der NADH-Bedarf der reduktiven Succinat-Bildung abgedeckt werden, was gleichzeitig die Notwendigkeit der Nebenproduktbildung minimieren würde.

3. Mit *sacB* als Gegenselektionsmarker, wurden in dieser Arbeit die Enzyme UPRTase (BVU_0984) und Purin-Nukleosid-Phosphorylase (BVU_3649) in *P. vulgatus* ausgeschaltet. Dadurch wurde erstmals gezeigt, dass eine Deletion von mehr als einem Gen in *P. vulgatus* möglich ist. Zusätzlich wurde die Grundlage für die Etablierung eines weiteren Systems für eine markerlose Gendelektion in *P. vulgatus* und verwandten Arten geschaffen, welches auf den Genen *bvu_0984* und *bvu_3649* als Gegenselektionsmarker unter Einsatz von 5-Fluor-Uracil basiert.
4. Im Hinblick auf eine biobasierte Succinat-Produktion ist aus biotechnologischer Sicht ein Produktionsstamm ideal, welcher aus nachwachsenden Rohstoffen ausschließlich Succinat ohne jegliche Nebenprodukte bildet. Neben Succinat synthetisiert *P. vulgatus* jedoch die metabolischen Endprodukte Acetat, Lactat, Formiat und Propionat. In dieser Arbeit wurde durch die Deletion der Gene *bvu_0309-10* zunächst die Methylmalonyl-CoA-Mutase in *P. vulgatus* ausgeschaltet. Dadurch konnte der Syntheseweg von Propionat unterbrochen werden, was in einer 95 %-igen Steigerung der Succinat-Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp resultierte. Durch die zusätzlichen Deletionen der D-Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) und der Pyruvat-Formiat-Lyase (BVU_2880) wurde neben Propionat ebenfalls die Endproduktbildung von Lactat und Formiat unterbunden. Auch wenn dadurch die Succinat-Ausbeute nicht weiter gesteigert werden konnte, ist die Deletion dieser Gene dennoch essenziell für die Generierung eines Homosuccinat-Produzenten. Durch zukünftige Anpassungen von Prozessparametern, sowie zusätzliche genetische Modifikationen, könnte die Succinat-Ausbeute weiter optimiert werden. Somit stellt die in dieser Arbeit generierte dreifache Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$ einen geeigneten und vielversprechenden Kandidaten für eine biotechnologisch nachhaltige und biobasierte Herstellung von Succinat dar.

6. Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2011): Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156 (4), 286-301.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013): Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 3 (6), 877-902.
- Abedi, E., Hashemi, S. M. B. (2020): Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6 (10), e04974.
- Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E., and Ameyama, M. (1979): Occurrence of old yellow enzyme in *Gluconobacter suboxydans*, and the cyclic regeneration of NADP. *Journal of Biochemistry*, 86, 699-709.
- Ahn, J. H., Jang, Y. S., Lee, S. Y. (2016): Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 54-66.
- Ahn, J. H., Seo, H., Park, W., Seok, J., Lee, J. A., Kim, W. J., et al. (2020). Enhanced Succinic Acid Production by *Mannheimia* Employing Optimal Malate Dehydrogenase. *Nature Communication*, 11, 1970–1982.
- Alias, N. F., Marsilla, K. I. K. (2020): Processes and characterization for biobased polymers from polybutylene succinate. *Processing and development of polysaccharide-based biopolymers for packaging applications*, 1 (1), 151–170.
- Aliotta, L., Gigante, V., Coltelli, M. B., Cinelli, P., Lazzeri, A. (2019): Evaluation of Mechanical and Interfacial Properties of Bio-Composites Based on Poly (Lactic Acid) with Natural Cellulose Fibers. *Internal Journal of Molecular Science*, 20, 960.
- Alonso, V. R., Guarner F. (2013): Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition*, 109, 21–26.
- Anderson, B. M., Anderson, C. D. (1995): Purification and characterization of *Azotobacter vinelandii* glucose-6-phosphate dehydrogenase: dual coenzyme specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321, 94-100.
- Anstall, H. B. (1968): Aspects of Glycogen Synthesis and Degradation. *American Journal of Clinical Pathology*, 50 (1), 3–11.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011): Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473 (7346), 174–180.
- Axe, D. D., Bailey, J. E. (1995): Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 8-19.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307 (5717), 1915–1920.
- Baez, W. D., Roy, B., McNutt, Z. A., Shatoff, E. A., Chen, S., Bundschuh, R., Fredrick, K. (2019): Global analysis of protein synthesis in *Flavobacterium johnsoniae* reveals the use of Kozak-like sequences in diverse bacteria. *Nucleic Acids Research*, 47 (20), 10477-10488.
- Balzer, G. J., Thakker, C., Bennett, G. N., San, K. Y. (2013): Metabolic engineering of *Escherichia coli* to minimize byproduct formate and improving succinate productivity through increasing NADH

- availability by heterologous expression of NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Engineering*, 20, 1–8.
- Basan, M., Hui, S., Okano, H., Zhang, Z., Shen, Y., Williamson, J. R., Hwa, T. (2015): Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature*, 528 (7580), 99-104.
- Bastawde, K. B. (1992): Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 353–368.
- Baughn, A. D., Malamy, M. H. (2003): The essential role of fumarate reductase in haem-dependent growth stimulation of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology*, 149, 1551–1558.
- Baughn, A. D., Malamy, M. H. (2004): The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*, 427 (6973), 441–444.
- Baumann, I., Westermann, P. (2016): Microbial production of short chain fatty acids from lignocellulosic biomass: current processes and market. *Biomed Research International*, 8469357.
- Bayley, D. P., Rocha, E. R., Smith, C. J. (2000): Analysis of *cepA* and other *Bacteroides fragilis* genes reveals a unique promoter structure. *FEMS Microbiology Letters*, 193, 149–154.
- Beauprez, J. J., De Mey, M., Soetaert, W. K., (2010): Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, 45 (7), 1103–1114.
- Beauprez, J. J., Foulquie-Moreno, M. R., Maertens, J. *et al.* (2011): Influence of C4-dicarboxylic acid transporters on succinate production, *Green Chemistry*, 13, 2179–2186.
- Becker, J., Reinefeld, J., Stellmacher, R., Schäfer, R., Lange, A., Meyer, H., Lalk, M., Zelder, O., von Abendroth, G., Schröder, H., Haefner, S., Wittmann, C. (2013): Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *Basfia succiniciproducens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (11), 3013-23.
- Becker, J., Lange, A., Fabarius, J., Wittmann, C. (2015): Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 168-75.
- Bencivenga-Barry, N. A., Lim, B., Herrera, C. M., Trent, M. S., Goodman, A. L. (2020): Genetic manipulation of wild human gut *bacteroides*. *Journal of Bacteriology*, 202, e00544-19.
- Bereswill, S., Fischer, A., Plickert, R., Haag, L.-M., Otto, B., Kühl, A. A. (2011): Novel murine infection models provide deep insights into the "ménage à trois" of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PLoS one*, 6 (6), e20953.
- Berni Canani, R., Di Costanzo, M., Leone, L. (2012): The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clinical Epigenetics*, 4, 4.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (2), 93–99.
- Boeke, J. D., LaCrute, F., Fink, G. R. (1984): A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular Genetics and Genomics*, 197 (2), 345–346.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. R. (1987): 5-fluoro-orotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology*. 154, 164–175.
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

- Bretz, K., Kabasci, S. (2012): Feed-control development for succinic acid production with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (5), 1187-92.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., Mevarech, M. (2003): Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the pyrE gene. *Journal of Bacteriology*, 185 (3), 772-778.
- Bryant, M. P., Small, N., Bouma, C., Chu, H. (1958): *Bacteroides ruminicola* n. sp. and *Succinimonas amylolytica*; the new genus and species; species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 76 (1), 15-23.
- Burk, M. J., Dien, S. V. (2016): Biotechnology for chemical production: challenges and opportunities. *Trends in Biotechnology*, 34, 187190.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., Segre, J. A.: The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16 (3), 143-155.
- Cao, Y., Zhang, R., Sun, C., Cheng, T., Liu, Y., Xian, M. (2013): Fermentative succinate production: an emerging technology to replace the traditional petrochemical processes. *Biomed Research International*, 2013, 723412.
- Carbonero, F., Benefiel, A. C., Gaskins, H. R. (2012): Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis. *Nature reviews gastroenterology and hepatology*, 9 (9), 504-518.
- Caspari, D., Macy, J. M. (1983): The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. *Archives of microbiology*, 135, 16-24.
- Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R. P., Maklashina, E. (2002): Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553 (1-2), 140-157.
- Chai, Y., Kolter, R., Losick, R. (2009): A widely conserved gene cluster required for lactate utilization in *Bacillus subtilis* and its involvement in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 191 (8), 2423-30.
- Chang, D. E., Jung, H. C., Rhee, J. S., Pan, J. G. (1999): Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1384-1389.
- Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M., Del'homme, C., Bernalier-Donadille, A. (2007): Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiology Ecology*, 61 (1), 121-31.
- Chatzidaki-Livanis, M., Coyne, M. J., Comstock, L. E. (2009): A family of transcriptional antitermination factors necessary for synthesis of the capsular polysaccharides of *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, 191, 7288-7295.
- Chen, S., Bagdasarian, M., Kaufman, M. G., Walker, E. D. (2007): Characterization of strong promoters from an environmental *Flavobacterium hibernum* strain by using a green fluorescent protein-based reporter system. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1089-1100.
- Chen, T., Long, W., Zhang, C., Liu, S., Zhao, L., Hamaker, B. R. (2017): Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*- versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota, *Scientific Report*, 7(1):2594.
- Chen, Y., Hung, S. T., Chou, E., Wu, H. S. (2018): Review of Polyhydroxyalkanoates Materials and other Biopolymers for Medical Applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 15, 105-121.

- Cheng, K. K., Wang, G. Y., Zeng, J., Zhang, J. A. (2013): Improved succinate production by metabolic engineering. *Biomed Research International*, 2013, 538790.
- Cheng, M., Ning, K. (2019): Stereotypes about enterotype: the old and new ideas. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17 (1), 4-12.
- Cinelli, P., Mallegni, N., Gigante, V., Montanari, A., Seggiani, M., Coltelli, M.B., Bronco, S., Lazzeri, A. (2019): Biocomposites based on polyhydroxyalkanoates and natural fibres from renewable byproducts. *Applied Food Biotechnology*, 6, 35–43.
- Clark, D. P. (1989): The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 5 (3), 223–234.
- Coiai, S., Di Lorenzo, M. L., Cinelli, P., Righetti, M. C., Passaglia, E. (2021): Binary Green Blends of Poly(lactic acid) with Poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) and Poly(butylene succinate-co-butylene adipate) and Their Nanocomposites. *Polymers*, 13 (15), 2489.
- Cok, B., Tsiropoulos, I., Roes, A. L. Patel, M. K. (2014): Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8, 16–29.
- Colombie, S., Dequin, S., Sablayrolles, J. (2003): Control of lactate production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a bacterial LDH gene. *Enzyme and Microbial Technology*. 33, 38–46.
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., Grunden, A. M. (2009): Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (3), 369-80.
- Coyne, M. J., Béchon, N., Matano, L. M., McEneaney, V. L., Chatzidaki-Livanis, M., Comstock, L. E. (2019): A family of anti-Bacteroidales peptide toxins wide-spread in the human gut microbiota. *Nature communications*, 10 (1), 3460.
- Cukalovic, A., Stevens, C. V. (2008): Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2, 505-529.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. (1997): Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Journal of Parenter Enteral Nutrition*, 21 (6), 357-65.
- Dai, Z., Guo, F., Zhang, S., Zhang, W., Yang, Q., Dong, W., Jiang, M., Ma, J. and Xin, F. (2020): Bio-based succinic acid: an overview of strain development, substrate utilization, and downstream purification. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14, 965-985.
- Dale, B. E. (2003): “Greening” the chemical industry: research and development priorities for biobased industrial products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78, 1093–1103.
- Datta, R., Tsai, S., Bonsignore, P., Moon, S., Frank, J. R. (1995): Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews*, 16, 221–231.
- Davis, C. P., Cleven, D., Brown, J., Balish, E. (1976): *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26, 498–504.
- Dehority, B. A. (1966): Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with a xylan medium. *Journal of Bacteriology*, 91 (5), 1724–1729.

- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., Bakker, B. M. (2013): The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54, 2325–2340.
- Deok, K. Y., Lee, S. Y., Kim, P. (2006): Influence of gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* under high bicarbonate condition. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 1448-1452.
- de Oliveira, R. A., Komesu, A., Rossell, C. E. V., Maciel Filho, R. (2018): Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design – from economic to production aspects. *The Journal of Biochemistry*, 133, 219–239.
- Dessie, W., Xin, F., Zhang, W., Jiang, Y., Wu, H., Ma, J., Jiang, M. (2018): Opportunities, challenges, and future perspectives of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (23), 9893-9910.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G. (2016): Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell metabolism*, 24 (1), 151-157.
- de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., Cani, P. D. (2022): Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 71 (5), 1020–1032.
- De Vries, W., Rietveld-Struijk, R. M., Stouthamer, A. H. (1977): ATP formation associated with fumarate and nitrate reduction in growing cultures of *Veillonella alcalescens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 43 (2), 153-67.
- Díaz, A., Katsarava, R., Puiggali, J. (2014): Synthesis, Properties and Applications of Biodegradable Polymers Derived from Diols and Dicarboxylic Acids: From Polyesters to Poly (ester amide) s. *International Journal of Molecular Science*, 15, 7064–7123.
- Dittrich, C. R., Bennett, G. N., San, K. Y. (2009): Metabolic engineering of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* for the simultaneous anaerobic production of isoamyl acetate and succinic acid, *Biotechnology Progress*, 25 (5), 1304–1309.
- Dodd, D., Mackie, R. I., Cann, I. K. (2011): Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. *Molecular Microbiology*, 79 (2), 292-304.
- Dong, J. M., Taylor, J. S., Latour, D. J., Iuchi, S., Lin, E. C. (1993): Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175, 6671–6678.
- Dowhan, W., Bogdanov, M., Mileykovskaya, E. (2016): Functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 6 (6), 1–40.
- Eggerth, A. H., Gagnon, B. H. (1933): The *Bacteroides* of Human Feces. *Journal of Bacteriology*, 25 (4), 389-413.
- England, C. G., Ehlerding, E. B., Cai, W. (2016): NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*, 27 (5), 1175-1187.
- Fabret, C., Ehrlich, S. D., Noirot, P. (2002): A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 46 (1), 25–36.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., Gordon, J. I. (2013): The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341, 1237439.

- Fan, Y., Pedersen, O. (2021): Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19 (1), 55-71.
- Ferraris, R. P. (2001): Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochemical Journal*, 360, 265–276.
- Fischbach, M. A., Sonnenburg, J. L. (2011): Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host & Microbe*, 10, 336–347.
- Fletcher, H. M., Schenkein, H. A., Morgan, R. M., Bailey, K. A., Berry, C. R., Macrina, F. L. (1995): Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W83 mutant defective in the prtH gene. *Infection and Immunity*, 63 (4), 1521-8.
- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., White, B. A. (2008): Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature reviews. Microbiology*, 6, 121–131.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., Forano, E. (2012): Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3 (4), 289-306.
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., Louis, P. (2015): Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 74 (1), 13–22.
- Franke, T., Deppenmeier, U. (2018): Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular microbiology*, 109 (4), 528–540.
- Franke, T., (2020): Aufklärung des zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus des Darmbakteriums *Prevotella copri*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Furukawa, N., Miyanaga, A., Togawa, M., Nakajima, M., Taguchi, H. (2014): Diverse allosteric and catalytic functions of tetrameric d-lactate dehydrogenases from three Gram-negative bacteria. *AMB Express*, 4, 76.
- Furukawa, N., Miyanaga, A., Nakajima, M., Taguchi, H. (2018): Structural basis of sequential allosteric transitions in tetrameric d-lactate dehydrogenases from three gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 57, 5388–5406.
- Galivan, J. H., Allen, S. H. (1968): Methylmalonyl coenzyme A decarboxylase. Its role in succinate decarboxylation by *Micrococcus lactilyticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 243 (6), 1253–1261.
- Ganguly, R., Dwivedi, P. Singh, R. (2007): Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. *Bioresource Technology*, 98, 1246–1251.
- García-Bayona, L., Comstock, L. E. (2019): Streamlined Genetic Manipulation of Diverse *Bacteroides* and *Parabacteroides* Isolates from the Human Gut Microbiota. *mBio*, 10 (4), e01762-19.
- García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Tindall, B. J., Gronow, S., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Hahnke, R. L., Göker, M. (2019): Analysis of 1,000 type-strain genomes improves taxonomic classification of Bacteroidetes. *Frontiers in microbiology*, 10 (1), 20-83.
- Garschagen, L. S. (2022): Über die Untersuchungen zum außergewöhnlichen Pentose-Metabolismus und die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in Darmbakterien Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Ge, T., Yang, J., Zhou, S., Wang, Y., Li, Y., Tong, X. (2020): The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 365.

- Gigante, V., Canesi, I., Cinelli, P., Coltelli, M.B., Lazzeri, A. (2019): Rubber Toughening of Polylactic Acid (PLA) with Poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT): Mechanical Properties, Fracture Mechanics and Analysis of Ductile-to-Brittle Behavior while Varying Temperature and Test Speed. *European Polymer Journal*, 115, 125–137.
- Gokarn, R., Eiteman, M. Altman, E. (1998): Expression of Pyruvate Carboxylase Enhances Succinate Production in *Escherichia coli* without Affecting Glucose Uptake. *Biotechnology Letters* 20, 795–798.
- Goodman, A. L., McNulty, N. P., Zhao, Y., Leip, D., Mitra, R. D., Lozupone, C. A., Knight, R., Gordon, J. I. (2009): Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat. *Cell Host & Microbe*, 6, 279–289.
- Gorkiewicz, G., Moschen, A. (2018): Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv*, 72 (1), 159-172.
- Grabar, T., Gong, W., Yocum, R. R. (2018): Metabolic evolution of *Escherichia coli* strains that produce organic acids. Patent No. 10017793. Myriant Corporation.
- Graf, N., Altenbuchner, J. (2011): Development of a method for markerless gene deletion in *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, 77 (15), 5549–5552.
- Greening, C., Biswas, A., Carere, C. R., Jackson, C. J., Taylor, M. C., Stott, M. B., Cook, G. M., Morales, S.E. (2016): Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *The ISME journal*, 10, 761–777.
- Garvie, E. I. (1980): Bacterial lactate dehydrogenases. *Clinical Microbiology Reviews*, 44 (1),106-39.
- Guarnieri, M. T., Chou, Y. C., Salvachúa, D., Mohagheghi, A., St John, P. C., Peterson, D. J., Bomble, Y. J., & Beckham, G. T. (2017): Metabolic Engineering of *Actinobacillus succinogenes* Provides Insights into Succinic Acid Biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 83 (17), e00996-17.
- Guettler, M. V., Jain, M. K., Soni, B. K. (1996): Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. U.S. patent 5,504,004.
- Guo, C. J., Allen, B. M., Hiam, K.J., Dodd, D., van Treuren, W., Higginbottom, S., Nagashima, K., Fischer, C. R., Sonnenburg, J. L., Spitzer, M. H., Fischbach, M. A. (2019): Depletion of microbiome-derived molecules in the host using *Clostridium* genetics. *Science*, 366.
- Gupta, A., Vlamakis, H., Shoemaker, N., Salyers, A. A. (2003): A new *Bacteroides* conjugative transposon that carries an *ermB* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6455–6463.
- Hamady, Z. Z. R., Farrar, M. D., Whitehead, T. R., Holland, K. T., Lodge, J. P. A., Carding, S. R. (2008): Identification and use of the putative *Bacteroides ovatus* xylanase promoter for the inducible production of recombinant human proteins. *Microbiology*, 154, 3165–3174.
- Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., Brummer, R. J. (2008): Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 27, 104–119.
- Hermann, B. G., Blok, K., Patel, M. K. (2007): Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. *Environmental Science & Technology*, 41, 7915– 7921.

- Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M. J., Dumon, C. (2015): White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances*, 33 (8), 1653-70.
- Hill, M. J. (1995): Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. *European Journal of Cancer Prevention*, 4, 353–358.
- Hilpert, W., Schink, B., Dimroth, P. (1984): Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion. *The EMBO Journal*, 3(8): 1665–1670.
- Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J., Rossmann, M. G. (1975): Lactate dehydrogenase. *The Enzymes*, 11, 191–292.
- Hong, S. H., Kim, J. S., Lee, S. Y., In, Y. H., Choi, S. S., Rih, J.-K., *et al.* (2004): The Genome Sequence of the Capnophilic Rumen Bacterium *Mannheimia Succiniciproducens*. *Nature Biotechnology*, 22, 1275–1281.
- Horecker, B. L., Gibbs, M., Klenow, H., Smyrniotis, P. Z. (1954): The mechanism of pentosephosphate conversion to hexose monophosphate. I. With a liver enzyme preparation. *Journal of Biological Chemistry*, 207 (1), 393-403.
- Horn, N., Carvalho, A. L., Overweg, K., Wegmann, U., Carding, S. R., Stentz, R. (2016): A novel tightly regulated gene expression system for the human intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1080.
- Human Microbiome Project Consortium (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207–214.
- Hwang, W. C., Bakolitsa, C., Punta, M., Coggill, P. C., Bateman, A., Axelrod, H. L., Rawlings, N. D., Sedova, M., Peterson, S. N., Eberhardt, R. Y., Aravind, L., Pascual, J., Godzik, A. (2013): LUD, a new protein domain associated with lactate utilization. *BMC Bioinformatics*, 14, 341.
- Ilmen, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., Penttila, M. (2007): Efficient production of l-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 117–123.
- Isar, J., Agarwal, L., Saran, S., Saxena, R. K. (2006): Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: process optimization and scale up in a bioreactor. *Anaerobe*, 12 (5-6), 231-7.
- Jackson, J. B., Peake, S. J., White, S. A. (1999): Structure and mechanism of proton-translocating transhydrogenase. *FEBS Letters*, 464 (1-2), 1-8.
- Jansen, M. L., van Gulik, W. M. (2014): Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Current opinion in biotechnology*, 30, 190–197.
- Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., Ingram, L. O. (2008): Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnology and bioengineering*, 101, 881–893.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2006): Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for l-(+)-lactic acid production using *Lactobacilli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134, 263–272.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2009): Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*, 27, 145–152.

- Jones, M. E. (1980): Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 253-279.
- Jones, K. R., Belvin, B. R., Macrina, F. L., Lewis, J. P. (2020): Sequence and characterization of shuttle vectors for molecular cloning in *Porphyromonas*, *Bacteroides* and related bacteria. *Molecular Oral Microbiology*, 35, 181–191.
- Kafarski, P. (2012): Rainbow code of biotechnology. *Chemik*, 66 (8), 811-816.
- Kang, Z., Gao, C. J., Wang, Q., Liu, H. M., Qi, Q. S. (2010): A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 101 (19), 7675–7678.
- Kell, D. B., Peck, M. W., Rodger, G., Morris, J. G. (1981): On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 99 (1), 81–88.
- Kim, P., Laivenieks, M., Vieille, C., Zeikus, J. G. (2004): Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 70 (2), 1238-1241.
- Kim, M. I., Kim, N. J., Shang, L., Chang, Y., Lee, S., Chang, H. N. (2009): Continuous production of succinic acid using an external membrane cell recycle system. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19 (11), 1369-1373.
- Kim, W. J., Ahn, J. H., Kim, H. U., Kim, T. Y., Lee, S. Y. (2017): Metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production based on elementary mode analysis with clustering. *Biotechnology Journal*, 12 (2).
- Kim, Y. S., Jang, J. Y., Park, S. J., Um, B. H. (2018): Dilute sulfuric acid fractionation of Korean food waste for ethanol and lactic acid production by yeast. *Waste Management Aktie*, 74, 231–240.
- Kino, Y., Nakayama-Imaohji, H., Fujita, M., Tada, A., Yoneda, S., Murakami, K., Hashimoto, M., Hayashi, T., Okazaki, K., Kuwahara, T. (2016): Counterselection employing mutated pheS for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species. *Anaerobe*, 42, 81-88.
- Kircher, M., Bott M., Marienhagen J. (2020): The Importance of Biotechnology for the Bioeconomy. Pietzsch, J. (Editor) *Bioeconomy for Beginners*. Berlin, Heidelberg: Springer, 105-128.
- Kochhar, S., Chuard, N., Hottinger, H. (1992): Cloning and overexpression of the *Lactobacillus bulgaricus* NAD(+)-dependent D-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 185, 705–12.
- 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), 8341–8349.
- Kristich, C. J., Manias, D. A., Dunny, G. M. (2005): Development of a method for markerless genetic exchange in *Enterococcus faecalis* and its use in construction of a srtA mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (10), 5837–5849.
- Kröger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., Lenger, L. (1992): Bacterial fumarate respiration. *Archives of Microbiology*, 158, 311.

- Kröniger, L., Berger, S., Welte, C., Deppenmeier, U. (2016): Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *The FEBS journal*, 283, 472–483.
- Kumar, R., Basak, B., Jeon, B. H. (2020): Sustainable production and purification of succinic acid: A review of membrane-integrated green approach. *Journal of Cleaner Production*, 277, 123954.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., Chang, H. N. (2002): Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 663–668.
- Lee, S. Y., Hong, S. H., Moon, S. Y. (2002): In silicometabolic pathway analysis and design: succinic acid production by metabolically engineered *Escherichia coli* as an example. *Genome Informatics*, 13, 214–223, 2002.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., Chang, H. N., & Park, S. C. (2003): Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology Letters*, 25 (2), 111–114.
- Lee, S. J., Lee, D. W., Choe, E. A., Hong, Y. H., Kim, S. B., Kim, B. C., Pyun, Y. R. (2005): Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH optimum. *Applied and environmental microbiology*, 71 (12), 7888–7896.
- Lee, S. J., Song, H., Lee, S. Y. (2006): Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3), 1939-48.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2010): Kinetic study on succinic acid and acetic acid formation during continuous cultures of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* grown on glycerol. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33 (4), 465–471.
- Lee, J. W., Yi, J., Kim, T. Y., Choi, S., Ahn, J. H., Song, H., Lee, M. H., Lee, S. Y. (2016): Homo-succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*. *Metabolic Engineering*, 38, 409-417.
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., Gordon, J. I. (2008): Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, 1647–1651.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J. Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H. B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Dore, J., Ehrlich, S. D. Bork, P., Wang, J., MetaHIT Consortium (2014): An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology*, 32 (8), 834–841.
- Li, L., Lin, J., Wu, N., Xie, S., Meng, C., Zheng, Y., Wang, X., Zhao, Y. (2020): Review and outlook on the international renewable energy development. *Energy and Built Environment*, 3, 2.
- Lim, B., Zimmermann, M., Barry, N. A., Goodman, A. L. (2017): Engineered regulatory systems modulate gene expression of human commensals in the gut. *Cell*, 169, 547–558.
- Lindner, J. G., Marcelis, J. H., Vos, N. M., Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1979): Intracellular polysaccharide of *Bacteroides fragilis*. *Journal of general microbiology*, 111 (1), 93–99.

- Litsanov, B., Brocker, M., Bott, M. (2012): Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Applied and environmental microbiology*, 78 (9), 3325–3337.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z. H., Ni, Y., Dong, J. J., Zhu, L. L. (2008): Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99 (6), 1736–42.
- Liu, R. M., Liang, L. Y., Chen, K. Q., et al. (2012): Fermentation of xylose to succinate by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 959–968.
- Lou, J., Dawson, K. A., Strobel, H. J. (1997): Glycogen Formation by the Ruminant Bacterium *Prevotella ruminicola*. *Applied and environmental microbiology*, 63 (4), 1483–1488.
- Louasté, B., Eloutassi, N. (2020): Succinic Acid Production from Whey and Lactose by *Actinobacillus succinogenes* 130Z in Batch Fermentation. *Biotechnology Reports*, 27, e00481–486.
- Lu, J., Li, J., Gao, H., Zhou, D., Xu, H., Cong, Y., Zhang, W., Xin, F., Jiang, M. (2021): Recent progress on bio-succinic acid production from lignocellulosic biomass. *World journal of microbiology & biotechnology*, 37 (1), 16.
- Ma, J., Hager, P. W., Howell, M. L., Phibbs, P. V., Hassett, D. J. (1998): Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* zwf gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *Journal of Bacteriology*, 180, 1741–1749.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. (2003): Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1), 67–72.
- Mancini, E., Mansouri, S.S., Gernaey, K.V., Luo, J., Pinelo, M. (2019): From second generation feedstocks to innovative fermentation and downstream techniques for succinic acid production. *Critical reviews in environmental science and technology*, 134, 1–45.
- March, J. C., Eiteman, M. A., Altman, E. (2002): Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11), 5620–4.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Aasamets, A., Viigand, K., Alamäe, T. (2017): A Highly Active Endo-Levanase BT1760 of a Dominant Mammalian Gut Commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* Cleaves Not Only Various Bacterial Levans, but Also Levan of Timothy Grass. *PLoS One*, 12 (1), e0169989.
- Martinussen, J., Hammer, K. (1994): Cloning and characterization of *upp*, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 176 (21), 6457–63.
- Mastropaolo, M. D., Thorson, M. L., Stevens, A. M. (2009): Comparison of *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Escherichia coli* 16S rRNA gene expression signals. *Microbiology*, 155, 2683–2693.
- McKendry, P. (2002): Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83, 37– 46.
- McKinlay, J. B., Vieille, C., Zeikus, J. G. (2007): Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 727–740.

- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S. and Soucaille, P. (2008): A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 129-135.
- Mimee, M., Tucker, A. C., Voigt, C. A., Lu, T. K. (2015): Programming a Human Commensal Bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to Sense and Respond to Stimuli in the Murine Gut Microbiota, *Cell Systems*, 1 (1), 62–71.
- Moore, W. E., Holdeman, L. V. (1974): Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27, 1450–1455.
- Mordor Intelligence (2021). Succinic Acid Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact and Forecasts (2021-2026). Online Verfügbar: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-bio-based-succinic-acid-market-industry> (abgerufen 13.02.2023).
- Moreau, A., Paradis, F. W., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. (1992): A novel shuttle vector for *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli* as a tool in site-directed mutagenesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 38 (4), 350-3.
- Morrison, D. J., Preston, T. (2016): Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, 7 (3), 189–200.
- Mott, J. E., Grant, R. A., Ho, Y. S., Platt, T. (1985): Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the λ P_L promoter: strategies for overproducing transcription termination factor p. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 82, 88–92.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263–273.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. (2010): Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Current Opinion in Lipidology*, 21, 76-83.
- Nakajima, H., Dijkstra, P., Loos, K. (2017): The recent developments in biobased polymers toward general and engineering applications: Polymers that are upgraded from biodegradable polymers, analogous to petroleum-derived polymers, and newly developed. *Polymers*, 9, 523.
- Nakayama-Imaohji, H., Ichimura, M., Iwasa, T., Okada, N., Ohnishi, Y., Kuwahara, T. (2012): Characterization of a gene cluster for sialoglycoconjugate utilization in *Bacteroides fragilis*. *The Journal of Medical Investigation*, 59, 79–94.
- Narancic, T., Cerrone, F., Beagan, N., O'Connor, K. E. (2020): Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation. *Polymers*, 12, 920.
- Nasser, H. A., Mahmoud, M., Tolba, M. M., Radwan, R. A., Gabr, N. M., ElShamy, A. A., Yehya, M. S., Ziemke, A., Hashem, M. Y. (2021): Pros and cons of using green biotechnology to solve food insecurity and achieve sustainable development goals. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6, 1-19.
- Neff, A., Lück, R., Hövels, M., Deppenmeier, U. (2023): Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. *Anaerobe*, 102742. [Epub ahead of print].

- Neuhard, J. (1982): Utilization of preformed pyrimidine bases and nucleosides. In: Munch-Petersen A (ed) Metabolism of nucleotides nucleosides and nucleobases in microorganisms. *Academic*, London, 95–148.
- Nghiem, N., Kleff, S., Schwegmann, S. (2017): Succinic Acid: Technology Development and Commercialization. *Fermentation*, 3 (2), 26.
- O'Hara, A. M., Shanahan, F. (2006): The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7 (7), 688–693.
- Hofvendahl, K., Hahn–Hagerdal, B. (2000): Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87–107.
- Oliphant, A. R., Struhl, K. (1988): Defining the consensus sequences of *E. coli* promoter elements by random selection. *Nucleic Acids Research*, 16 (15), 7673–83.
- Parker, A. C., Smith, J. C. (2012): Development of an IPTG inducible expression vector adapted for *Bacteroides fragilis*. *Plasmid*, 68, 86–92.
- Pateraki, C., Patsalou, M., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Webb, C., Koutinas, A. A. et al. (2016): *Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 285–303.
- Peck, R. F., Das Sarma, S., Krebs, M. P. (2000): Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. *Molecular Microbiology*, 35 (3), 667–676.
- Peters, B., Junker, A., Brauer, K., Mühlthaler, B., Kostner, D., Mientus, M., Liebl, W., Ehrenreich, A. (2013): Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (6), 2521–30.
- Pinazo, J. M., Domine, M. E., Parvulescu, V., Petru, F. (2015): Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes. *Catalysis Today*, 239, 17–24.
- Preiss, J. (1984): Bacterial Glycogen Synthesis and its Regulation. *Annual Review of Microbiology*, 38 (1), 419–458.
- Pritchett, M. A., Zhang, J. K., Metcalf, W. W. (2004): Development of a markerless genetic exchange method for *Methanosarcina acetivorans* C2A and its use in construction of new genetic tools for methanogenic archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3), 1425–1433.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C. (2010): A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464 (7285), 59–65.
- Raab, A. M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D., Lang, C. (2010): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic engineering*, 12, 518–525.
- Radano, C. P., Baker, G. L., Smith I. I. I., M. R., (2000): Stereoselective polymerization of a racemic monomer with a racemic catalyst: direct preparation of the polylactic acid stereocomplex from racemic lactide. *Journal of American Chemical Society*, 122, 1552–1553.
- Ragunathan, S., Levy, H. R. (1994): Purification and characterization of the NAD-preferring glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310, 360–366.

- 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), 711-8.
- Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., Flint, H. J., Louis, P. (2014): Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*, 8 (6), 1323–1335.
- Ried, J. L., Collmer, A. (1987): A nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-ejection mutagenesis. *Gene*, 57 (2-3), 239-46.
- Russell, J. B., Diez-Gonzalez, F. (1998): The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology*, 39, 205-34.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Nara, M., Kitakata, A., Kurihara, S. (2018): Functional analysis of arginine decarboxylase gene speA of *Bacteroides dorei* by markerless gene deletion. *FEMS Microbiology Letters*, 1, 365.
- Salek, S. S., Van Turnhout, A. G., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. M. (2015): pH control in biological systems using calcium carbonate. *Biotechnology and bioengineering*, 112 (5), 905-913.
- Salonen, A., Lahti, L., Salojarvi, J., Holtrop, G., Korpela, K., Duncan, S. H., Date, P., Farquharson, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Louis, P., Flint, H. J., de Vos, W. M. (2014): Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *The ISME Journal*, 8, 2218–2230.
- Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M., Nicol, W., Black, B. A., Biddy, M. J., Dowe, N., & Beckham, G. T. (2016): Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 9, 28.
- Salyers, A. A. (1984): *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annual review of microbiology*, 38 (1), 293–313.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor*, Vol. 2, S. 1.
- Samuelov, N. S., Lamed, R., Lowe, S., Zeikus, J. G. (1991): Influence of CO₂-HCO₃⁻ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3013–3019.
- Saxena, R. K., Saran, S., Isar, J., Kaushik, R. (2017): Production and applications of succinic acid. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 601-630.
- Scheifinger, C. C., Wolin, M. J. (1973): Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 26, 789–795.
- Schlegel, K., Welte, C., Deppenmeier, U., Müller, V. (2012): Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex. *The FEBS journal*, 279 (24), 4444–4452.
- Scholten, E., Renz, T., Thomas, J. (2009): Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnology Letters*, 31 (12), 1947-1951.

- Schuller, J. M., Birrell, J. A., Tanaka, H., Konuma, T., Wulfhorst, H., Cox, N., Schuller, S. K., Thiemann, J., *et al.* (2019): Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer. *Science*, 363, 257–260.
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeyer, C., Thauer, R. K., Gottschalk, G. (2008): The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 105 (6), 2128–33.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010): Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90, 859–904.
- Sellés Vidal, L., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., Heap, J. T. (2018): Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 1866 (2), 327–347.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016): Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS biology*, 14 (8), e1002533.
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P., Dore, J. (2000): Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2263–2266.
- Shanahan, F. (2002): The host-microbe interface within the gut. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 16 (6), 915–931.
- Singh, A., Soh, K. C., Hatzimanikatis, V., Gill, R. T. (2011): Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 13, (1), 76– 81, 2011.
- Smith, C. J., Rogers, M. B., McKee, M. L. (1992): Heterologous gene expression in *Bacteroides fragilis*. *Plasmid*, 27 (2), 141–54.
- Smith, C. J. (1995): Genetic transformation of *Bacteroides* spp. Using electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 47, 161–169.
- Soetaert, W., Vandamme, E. (2006): The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal*, 1 (7-8), 756–69.
- Spaans, S. K., Weusthuis, R. A., van der Oost, J., Kengen, S. W. (2015): NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*, 29 (6), 742.
- Steuber, J., Vohl, G., Muras, V., Toulouse, C., Claußen, B., Vorburger, T., Fritz, G. (2015): The structure of Na⁺-translocating of NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio cholerae*: implications on coupling between electron transfer and Na⁺ transport. *Biological chemistry*, 396, 1015–1030.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M.; Campbell, K.; Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer, A. M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J.D., Ralser, M. (2015): The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society*, 90 (3), 927–63.
- Stoll, V. S., Manohar, A. V., Gillon, W., MacFarlane, E. L., Hynes, R. C., Pai, E. F. (1998): A thioredoxin fusion protein of VanH, a D-lactate dehydrogenase from *Enterococcus faecium*: cloning, expression, purification, kinetic analysis, and crystallization. *Protein Science*, 7 (5), 1147–55.
- Stournaras, C., Butz, F. B., and Kurts, G. (1982): 6-Phospho-D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Methods in Enzymology*, 89, 278–283.

- Takahashi, N., Yamada, T. (2000): Glucose metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral microbiology and immunology*, 15 (3), 188–195.
- Tan, H., Zhai, Q., Chen, W. (2019): Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Research International*, 116, 637-644.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C. T., Lin, H., Masters, S. L., Gottlieb, E., Kelly, V. P., Clish, C., Auron, P. E., Xavier, R. J., O'Neill, L. A. (2013): Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 496 (7444), 238–242.
- Thoma, F., Schulze, C., Gutierrez-Coto, C., Hädrich, M., Huber, J., Gunkel, C., Thoma, R., Blombach, B. (2022): Metabolic engineering of *Vibrio natriegens* for anaerobic succinate production. *Microbial Biotechnology*, 15 (6), 1671-1684.
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G. (2011): Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 30 (2), 93.
- Thongchul, N., Navankasattusas, S., Yang, S. T. (2010): Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 407–416.
- Tonouchi, N., Sugiyama, M., Yokozeki, K. (2003): Coenzyme specificity of enzymes in the oxidative pentose phosphate pathway of *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (12), 2648-51.
- Towbin, H., Staehelin, T., Goridon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9), 4350–4.
- Tovilla-Coutiño, D. B., Momany, C., & Eiteman, M. A. (2020): Engineered citrate synthase alters Acetate Accumulation in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 61, 171-180.
- Tremaroli, V., Backhed, F. (2012): Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489, 242–249.
- Tsuji, H. (2005): Poly(lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications. *Macromolecular Bioscience*, 5, 569–597.
- Tylecote, A., (2019): Biotechnology as a new techno-economic paradigm that will help drive the world economy and mitigate climate change. *Research Policy*, 48 (4), 858-868.
- Upadhyaya, B. P., DeVeaux, L. C., Christopher, L. P. (2014): Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends in Biotechnology*, 32 (12), 637-44.
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., Mattanovich, D. (2006): Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5492–5499.
- Vanderhaeghen, S., Lacroix, C., Schwab, C. (2015): Methanogen communities in stools of humans of different age and health status and co-occurrence with bacteria. *FEMS microbiology Letters*, 362 (13), fnv092.

- van der Werf, M. J., Guettler, M. V., Jain, M. K., Zeikus, J. G. (1997): Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of Microbiology*, 167 (6), 332–342.
- van Heerden, C. D., Nicol, W. (2013): Continuous and batch cultures of *Escherichia coli* KJ134 for succinic acid fermentation: metabolic flux distributions and production characteristics. *Microbial cell factories*, 12, 80.
- Veronese, F. M., Boccu, E., and Fontana, A. (1982): 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Methods in Enzymology*, 89, 282-291.
- Vingadassalom, D., Kolb, A., Mayer, C., Rybkine, T., Collatz, E., Podglajen, I. (2005): An unusual primary sigma factor in the Bacteroidetes phylum. *Molecular Microbiology*, 56, 888–902.
- Wan, Y., Yuan, J., Li, J., Li, H., Yin, K., Wang, F., Li, D. (2020): Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clinical nutrition* 39 (10), 3189–3198.
- Wang, J., Shoemaker, N. B., Wang, G. R., Salyers, A. A. (2000): Characterization of a *Bacteroides* mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *Journal of Bacteriology*, 182 (12), 3559-7.
- Wang, D., Li, Q., Song, Z., Zhou, W., Su, Z., Xing, J. (2011): High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86, 512-518.
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S. J., Liu, H. (2019): *Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell reports*, 26 (1), 222–235.
- Weerakoon, D. R., Olson, J.W. (2008): The *Campylobacter jejuni* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) utilizes flavodoxin rather than NADH. *Journal of Bacteriology*, 190, 915–925.
- Wegmann, U., Horn, N., Carding, S. R. (2013): Defining the *Bacteroides* ribosomal binding site. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1980–1989.
- Weitzman, P. D. J., Jones, D. (1968): Regulation of citrate synthase and microbial taxonomy. *Nature*, 219 (5151), 270-272.
- Wexler, A., Goodman, A. (2017): An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. *Nature Microbiology*, 2, 17026.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. (1998): Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 95, 6578–6583.
- Wiegand, G., Remington, S. J. (1986): Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annual Reviews of Biophys Biophys Chem*, 15, 97-117.
- Willke, T., Vorlop, K. D. (2004): Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 131–142.
- Wolf, P. G., Biswas, A., Morales, S. E., Greening, C., Gaskins, H. R. (2016): H₂ metabolism is widespread and diverse among human colonic microbes. *Gut microbes*, 7, 235–245.
- Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., Jenkins, D. J. (2006): Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40 (3), 235-43.

- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., Lewis, J. D. (2011): Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334 (6052), 105-8.
- Xu, C., Zhang, J., Zhang, Y., Guo, Y., Xu, H., Xu, J. (2018): Long chain alcohol and succinic acid co-production process based on full utilization of lignocellulosic materials. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 1–9.
- Yu, J.-H., Zhu, L.-W., Xia, S.-T., Li, H.-M., Tang, Y.-L., Liang, X.-H., Chen, T., Tang, Y.-J. (2016): Combinatorial optimization of CO₂ transport and fixation to improve succinate production by promoter engineering. *Biotechnology and bioengineering*, 113, 1531–1541.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., Elankovan, P. (1999): Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied microbiology and biotechnology*, 51 (5), 545-552.
- Zhou, S., Causey, T. B., Hasona, A., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2003): Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), 399-407.
- Zhu B., Wang X., Li L. (2010): Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell* 1 (8), 718-25.
- Zhu, N., Xia, H., Wang, Z., Zhao, X., Chen, T. (2013): Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in *Corynebacterium glutamicum*. *PLOS One*, 8 (4), e60659.
- Zhu, X., Tan, Z., Xu, H., Chen, J., Tang, J., Zhang, X. (2014): Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 4, 87-96.
- Zhu, N., Xia, H., Yang, J., Zhao, X., and Chen, T. (2014): Improved succinate production in *Corynebacterium glutamicum* by engineering glyoxylate pathway and succinate export system. *Biotechnology Letters*, 36, 553–560.

7. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die die Erstellung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Vergabe dieses sehr spannenden, vielversprechenden, sowie herausfordernden Themas meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich für die zahlreichen und intensiven Diskussionen, die dazu beigetragen haben, meine wissenschaftlichen Fähigkeiten zu stärken und verschiedene Sichtweisen der Wissenschaft kritisch zu hinterfragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Christiane Dahl für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken, sowie für die fortlaufende Unterstützung bei jeglicher Fragestellung.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger, die sich bereit erklärt haben, als fachnahes und fachfremdes Mitglied meiner Prüfungskommission beizuwohnen.

Mein außerordentlicher Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Deppenmeier, die während der letzten Jahre zu Freunden geworden sind. Besonders bedanken möchte ich mich bei Mélanie, Paulina, Franzi, Marcel und André. Ihr habt es mir leicht gemacht trotz mancher Hürden immer gerne ins Labor zu kommen und ich werde unsere gemeinsame Zeit sicherlich vermissen. Mein größter Dank geht natürlich an André. Wer hätte zu Beginn der Ausbildung damals gedacht, dass wir uns gemeinsam durch die Bachelorarbeit, Masterarbeit und Doktorandenzeit kämpfen. Ich konnte und kann mich immer zu 100 % auf dich verlassen und dafür bin ich sehr dankbar. Als zweiter Teil von „ANRU“ wird mir unsere gemeinsame Laborzeit sehr fehlen.

Zudem bedanke ich mich bei allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Deppenmeier, die ebenfalls ein wichtiger Teil auf diesem Weg waren. Besonders hervorheben möchte ich Juliane. Ich bin dankbar, dass aus unserer kurzen, gemeinsamen Laborzeit dennoch eine so gute Freundschaft entstanden ist.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei den wohl wichtigsten Menschen bedanken, die sich in meinem Leben befinden. Meinem Ehemann Lars, meinen Eltern und meiner Schwester Louisa für die Liebe, das Verständnis und für die Unterstützung, die man in so einer intensiven Zeit definitiv benötigt. Ihr habt mich in den letzten Jahren in all meinen Entscheidungen unterstützt und immer an mich geglaubt, wenn ich es nicht getan habe. Eure Liebe und euren Rückhalt möchte ich nie missen müssen.