

**Enzymatische Herstellung und Reinigung von  
Fructooligosacchariden des Inulin-Typs und deren  
Verwertung durch abundante Darmbakterien**

**Dissertation**

Zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Franziska Wienberg**

aus Langenhagen

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: 09.01.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Wienberg, F., Hövels, M., Kosciow, K., Deppenmeier, U. (2021):** High-resolution method for isocratic HPLC analysis of inulin-type fructooligosaccharides., *J. Chromatogr. B.*, 1172: 122505. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122505>

**Wienberg, F., Hövels, M., Deppenmeier, U. (2022):** High-yield production and purification of prebiotic inulin-type fructooligosaccharides. *AMB Express*, 12(1): 144. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01485-9>

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Fructooligosaccharide des Inulin-Typs (I-FOS) und andere Fructane .....	1
1.2 Inulosucrasen .....	3
1.3 Definition und Wirkung von Präbiotika und Probiotika .....	3
1.4 Medizinisches und wirtschaftliches Interesse an I-FOS.....	5
1.5 Industrielle I-FOS-Produktion .....	6
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
2.1 Chemikalien, Reagenzien und andere Materialien .....	10
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.1.2 Gase .....	10
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	10
2.2 Organismen und Plasmide .....	11
2.2.1 Organismen.....	11
2.2.2 Plasmid.....	12
2.3 Software .....	12
2.4 Mikrobiologische Methoden.....	13
2.4.1 Sterilisation der Medien und Medienbestandteile.....	13
2.4.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 pASK3_InuGB-V3 .....	13
2.4.3 Kultivierung der Darmbakterien .....	14
2.4.4 Kultivierung der Darmbakterien in Mikrotiterplatten zur Bewertung des Wachstums auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs .....	17
2.4.5 Bestimmung der optischen Dichte (OD <sub>600</sub> ) von Bakterienkulturen .....	20
2.4.6 Stammerhaltung der verwendeten Bakterien .....	20
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.5.1 Heterologe Produktion des InuGB-V3-Rohenzym in <i>E. coli</i> BL21 .....	21
2.5.2 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	21
2.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford.....	22
2.5.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
2.6 Aktivitätsbestimmung von InuGB-V3 und InuGB-V3-Rohenzym.....	23



2.6.1	Bestimmung der volumetrischen Aktivität von InuGB-V3-Rohenzym .....	24
2.6.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität von InuGB-V3.....	24
2.6.3	Bestimmung der Temperaturstabilität des InuGB-V3-Rohenzym.....	24
2.7	Enzymatische I-FOS-Synthese und Optimierung der I-FOS-Produktionsparameter.....	24
2.7.1	Bestimmung der erforderlichen Menge an InuGB-V3-Rohenzym .....	25
2.7.2	Enzymtests zur Optimierung der I-FOS-Produktionsparameter .....	25
2.7.2.1	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> und EDTA auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3-Rohenzym.....	25
2.7.2.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3- Rohenzym .....	26
2.7.2.3	Einfluss der Temperatur auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3- Rohenzym .....	26
2.7.3	Enzymatische Synthese von I-FOS durch aufgereinigte InuGB-V3.....	26
2.7.4	Enzymatische Synthese von I-FOS durch InuGB-V3-Rohenzym aus 570 g L <sup>-1</sup> Saccharose .....	26
2.7.5	Enzymatische Synthese von I-FOS durch InuGB-V3-Rohenzym aus 800 g L <sup>-1</sup> Saccharose .....	27
2.8	Enzymatische Nachweismethoden .....	27
2.8.1	Bestimmung von Glucose-Konzentrationen mittels des D-Glucose-Assay-Kits (GOPOD-Assay) .....	27
2.8.2	Enzymatische Hydrolyse von Fructanen des Inulin- und Levan-Typs .....	28
2.9	Chromatographische Analyse von Zuckern und FOS.....	28
2.9.1	Probenvorbereitung .....	29
2.9.2	Verwendete Instrumentation und Messbedingungen.....	29
2.9.3	Validierung der HPLC-Methode .....	30
2.10	Aufreinigung von I-FOS mit Aktivkohle .....	30
2.10.1	Protokoll-Entwicklung im 1-mL-Maßstab .....	31
2.10.2	Upscaling auf einen 1-L-Maßstab .....	32
2.10.3	Aufbereitung der I-FOS .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Produktion der Inulosucrase InuGB-V3 .....	33
3.1.1	Die Inulosucrase InuGB-V3 .....	33
3.1.2	Produktion, Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung von InuGB-V3 .....	35

3.2	Entwicklung einer hochauflösenden Methode für die isokratische HPLC-Analyse von I-FOS.....	39
3.2.1	Chromatographische Analyse von kommerziell erhältlichen I-FOS.....	39
3.2.2	Enzymatische Synthese von I-FOS mit aufgereinigter InuGB-V3 und deren Analyse mit der entwickelten HPLC-Methode.....	42
3.2.3	Validierung der Methode.....	44
3.2.4	Wechsel zur Polymer-basierten Aminophasen-Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E .....	46
3.3	Enzymatischen Synthese von I-FOS mit aufgereinigter InuGB-V3.....	48
3.4	Charakterisierung des InuGB-V3-Rohenzym.....	51
3.4.1	Einfluss von Ionen.....	52
3.4.2	Einfluss des pH-Wertes .....	53
3.4.3	Einfluss der Temperatur .....	54
3.4.4	Temperaturstabilität.....	55
3.5	Produktion von I-FOS mit InuGB-V3-Rohenzym unter optimierten Bedingungen.....	56
3.5.1	Analyse der I-FOS-Produktion.....	56
3.5.2	Upscaling der I-FOS-Produktion auf 10 L .....	58
3.6	Aufreinigung der produzierten I-FOS mittels Aktivkohle .....	61
3.6.1	Protokoll-Entwicklung.....	62
3.6.2	Upscaling des Aufreinigungs-Prozesses auf einen 1-L-Maßstab.....	68
3.7	Wachstum von bakteriellen Vertretern der menschlichen Darmmikrobiota auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs.....	70
3.7.1	Analyse der eingesetzten Fructane.....	72
3.7.2	Wachstumsversuche mit menschlichen Darmbakterien .....	76
3.7.2.1	Wachstum der Darmbakterien auf Glucose, Fructose und Maltose.....	76
3.7.2.2	Wachstum von <i>C. intestinalis</i> auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs.....	77
3.7.2.3	Wachstum der Bacteroidota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs.....	78
3.7.2.4	Wachstum der Bacillota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs ..	80
3.7.2.5	Fähigkeit der untersuchten Darmbakterien zum Fructan-Abbau .....	82
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
4.1	Die Bedeutung der menschlichen Darmmikrobiota für die Gesundheit.....	84
4.1.1	Darmmikrobiota-Zusammensetzung .....	84
4.1.2	Funktionen der Darmmikrobiota .....	86

4.1.3	Dysbiose der Darmmikrobiota .....	86
4.1.4	Einflussfaktoren auf die Darmmikrobiota .....	87
4.1.5	Modulation der Darmmikrobiota durch Präbiotika .....	88
4.2	Entwicklung eines Herstellungsprozesses für I-FOS .....	92
4.2.1	Optimierung der Produktion von InuGB-V3-Rohenzym .....	93
4.2.2	Entwicklung einer hochauflösenden Methode für die isokratische HPLC-Analyse von I-FOS.....	95
4.2.3	Charakterisierung des InuGB-V3-Rohenzyms .....	98
4.2.4	I-FOS Synthese unter Verwendung von InuGB-V3.....	100
4.2.5	Aufreinigung der produzierten I-FOS.....	108
4.2.5.1	Literaturangaben zur Aufreinigung von I-FOS.....	108
4.2.5.2	Anwendung von Aktivkohle zur Aufreinigung der in dieser Arbeit produzierten I- FOS.....	111
4.3	Untersuchungen zum Wachstum kommensaler Darmbakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs .....	113
4.3.1	Substrat-Spezifität und Fructan-Abbau-Mechanismen der Darmbakterien .....	116
4.3.2	Wachstum von Bacteroidota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan- Typs.....	122
4.3.3	Wachstum von Bacillota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs...	123
4.3.4	Untersuchungen von <i>C. intestinalis</i> und <i>C. leptum</i> im Hinblick auf Fructan- Verwertung .....	125
4.3.5	Assoziation der untersuchten Bakterien mit der menschlichen Gesundheit .....	125
4.3.6	Präbiotisches Potential der synthetisierten bakteriellen I-FOS, L-FOS und Levan..... .....	130
4.4	Die Bedeutung individueller Reaktionen auf Präbiotika und zukünftige Anwendungsperspektiven.....	132
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>170</b>

## Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A.	<i>Agathobacter</i>
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetrazyklin
AMP <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäuren
B.	<i>Bacteroides</i>
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. intestinalis</i>	<i>Collinsella intestinalis</i>
<i>C. leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i>
D.	<i>Dorea</i>
Da	Dalton
DM	<i>Defined Mineral</i>
DP	Polymerisierungsgrad
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Elutionsfraktion
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et aliae/alii</i>
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
F.	<i>Faecalibacterium</i>
Fn	FOS-Struktur mit Anzahl (n) der Fructose (F) Einheiten
FODMAP	<i>Fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, and polyols</i>
FOS	Fructooligosaccharid(e)
GFn	FOS-Struktur mit Anzahl (n) der Glucose (G) und Fructose (F) Einheiten
GH32	Glycosidhydrolase-Familie 32
GH68	Glycosidhydrolase-Familie 68
GOPOD	D-Glucose Assay Kit (Megazyme)
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	Demineralisiertes Wasser
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HPAEC-PAD	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I-FOS	Fructooligosaccharide des Inulin-Typs
IBD	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
InuGB-V3	Rekombinante Variante V3 der Inulosucrase aus <i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604
kDa	Kilodalton
L-FOS	Fructooligosaccharide des Levan-Typs
L.	<i>Lactobacillus</i>
<i>L. citreum</i>	<i>Lactobacillus citreum</i>
LB	Lysogeny-Broth
Lsg.	Lösung
NT	Nukleotid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm

<i>P. johnsonii</i>	<i>Parabacteroides johnsonii</i>
<i>P. vulgatus</i>	<i>Phocaeicola vulgatus</i>
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB ID	<i>Protein Data Bank</i> Kennziffer (3D-Strukturdatenbank)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PY	<i>Peptone Yeast</i>
<i>R.</i>	<i>Ruminococcus</i>
R <sub>s</sub>	Auflösung
RSD	Relative Standardabweichung
<i>S.</i>	<i>Segatella</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SCFAs	<i>Short-chain fatty acids</i> ; Kurzkettige Fettsäuren
scFOS	<i>Short-chain</i> Fructooligosaccharide
sd	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	species pluralis
Tab.	Tabelle
TB	Terrific-Broth
TPY	<i>Tryptone Peptone Yeast</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
YCFA	<i>Yeast Casitone Fatty Acids</i>
Einheitszeichen	Einheit
%	Prozent
% [v/v]	Volumenprozent
% [w/v]	Gewichtsprozent
% [w/w]	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
x g	relative Zentrifugalkraft
cm	Centimeter
g	Gramm
h	Stunde(n)
L	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde(n)
U	Einheit der Enzymaktivität (units) [μmol min <sup>-1</sup> ]
V	Volt
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol

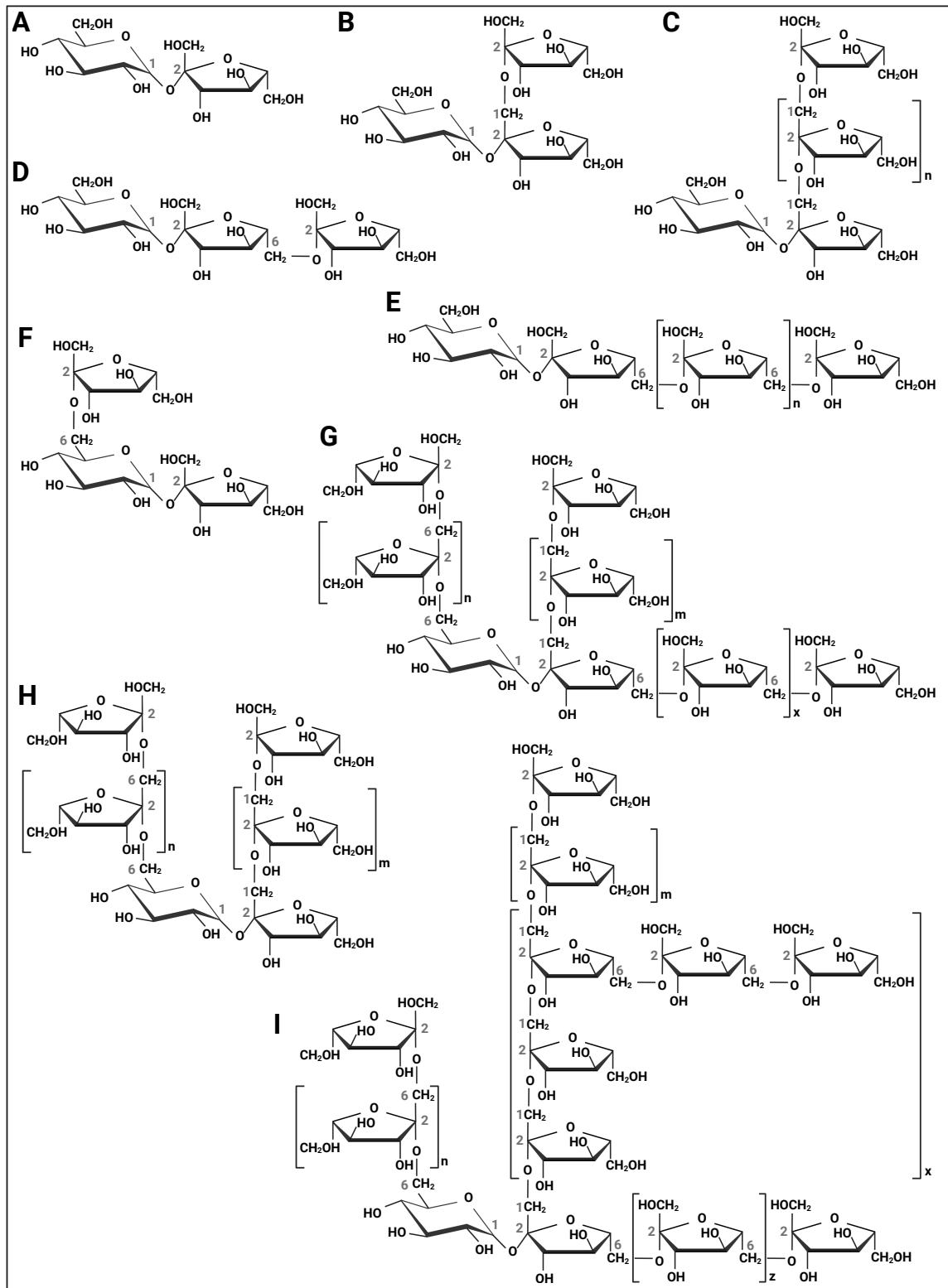
# 1 Einleitung

## 1.1 Fructooligosaccharide des Inulin-Typs (I-FOS) und andere Fructane

Etwa 15 % aller höherer Pflanzen (Hendry 1993), zahlreiche Bakterien und Pilze, aber auch einige Algen und Archaeen, können verschiedene Fructane aus Saccharose synthetisieren (Kirtel et al. 2019; Ni et al. 2019; Vijn und Smeekens 1999). Fructane sind wasserlösliche Poly- und Oligosaccharide, die vornehmlich oder ausschließlich aus Fructose-Einheiten aufgebaut sind. Direkt synthetisierte Fructane enthalten zudem Glucose-Reste (GFn-Struktur, mit  $n$  = die Anzahl der Fructose-Einheiten, Abb. 1) (Van den Ende und Öner 2023).

Die Klassifizierung von Fructanen erfolgt anhand ihres Polymerisierungsgrades (DP), der Verknüpfung der Monomer-Einheiten, sowie ihrer Komplexität (Hernández und Plou 2023). Fructane liegen stets als polydisperse Mischung vor, wobei kurzkettige Fructooligosaccharide (FOS, DP 2-9) von den langkettigen Polymeren (DP  $\geq$  10) abgegrenzt werden (Hernández und Plou 2023). Aufgrund der fluiden Anwendung der Nomenklatur werden in vielen Fällen auch Moleküle mit DP > 10 FOS genannt.

Es wird zwischen vier Fructan-Typen unterschieden: Inulin, Levan, Graminan und Neo-Fructan (Synonym: Fructane der neo-Serie) (Abb. 1, Hernández und Plou 2023). Bei linearem Inulin sind die Fructose-Einheiten über  $\beta$ -(2,1)-glykosidische Bindungen verknüpft, während lineares Levan im Gegensatz dazu  $\beta$ -(2,6)-Fructosyl-Fructose-Bindungen aufweist (Abb. 1). Diese Fructane können auch vereinzelte Verzweigungen aufweisen, sodass geringe Anteile an  $\beta$ -(2,6)- bzw.  $\beta$ -(2,1)-glykosidische Bindungen in verzweigtem Inulin und Levan vorkommen. Die kürzesten, direkt synthetisierten FOS des Inulin- bzw. Levan-Typs (I-FOS bzw. L-FOS) sind 1-Kestotriose (DP3, GF2) bzw. 6-Kestotriose (DP3, GF2) (Abb. 1). Aus der Hydrolyse von Fructanen werden neben FOS des GFn-Typs hauptsächlich FOS freigesetzt, die ausschließlich aus Fructose bestehen (Fn-Struktur, mit  $n$  = die Anzahl der Fructose-Einheiten, Abb. 2). Inulobiose (DP2, F2) bzw. Levanbiose (DP2, F2) sind die kürzesten I-FOS bzw. L-FOS des Fn-Typs. Die Fructane der Neo-Serie enthalten ein zentrales Glucose-Monomer, da auch an das C6-Atom der Glucose-Einheit der Akzeptor-Saccharose ein Fructose-Monomer angeknüpft ist (Abb. 1). Beide Fructose-Reste des kürzesten FOS der neo-Serie 6G-Kestotriose können polymerisiert werden (Abb. 1). Graminane sind komplexere Fructane, die  $\beta$ -(2,1)- und  $\beta$ -(2,6)-glykosidische Bindungen in ähnlichem Verhältnis zueinander enthalten und in der Regel verzweigt sind. Auch Graminane können einen zentralen Glucose-Rest enthalten (Abb. 1). Agavine sind hochgradig verzweigte neo-Fructane (Abb. 1, Hernández und Plou 2023).



**Abb.1. Struktur von Saccharose und verschiedenen Fructanen. (A) Saccharose. (B) 1-Kestotriose. (C) Inulin. (D) 6-Kestotriose. (E) Levan. (F) 6G-Kestotriose (neo-Fructan). (G) Graminan. (H) Neo-Inulin. (I) Agavin. Abb. erstellt mit Biorender.com.**

## 1.2 Inulosucrasen

Die Synthese von Fructanen wird von sogenannten Fructosyltransferasen ( $\beta$ -D-Fructosyltransferase, EC 2.4.1.9) katalysiert. Fructosyltransferasen die die Synthese von Inulin und I-FOS katalysieren werden als Inulosucrasen (EC 2.4.1.9) bezeichnet und können von Levansucrasen (EC 2.4.1.10) unterschieden werden, die hauptsächlich Fructane vom Levan-Typ bilden (Ozimek et al. 2006b). Bei der enzymatischen Reaktion von Fructosyltransferasen wird die glycosidische Bindung des Substrates Saccharose gespalten und die Fructose-Einheit auf einen Akzeptor übertragen. Bei dem Akzeptor kann es sich um Saccharose oder ein Fructan-Molekül handeln (Transfructosylierungs-Reaktion). Eine Übertragung der Fructose-Einheit auf Wasser ist ebenfalls möglich, was zur Hydrolyse von Saccharose zu Glucose und Fructose führt (Hydrolyse-Reaktion, Ozimek et al. 2006b).

Inulosucrasen werden in Pflanzen, Pilz-, Archaeen- und Bakteriengenomen kodiert (Ghauri et al. 2020; Kirtel et al. 2019; Ni et al. 2019; Sangeetha et al. 2005). Im Vergleich zu Pflanzen und Pilzen sind Bakterien oft leichter genetisch zugänglich und haben kürzere Generationszeiten, was ein vielseitiges Screening nach Enzymen zu alternativen Inulin/I-FOS-Produktionsstrategien ermöglicht. Bakterielle Inulosucrasen, die ausschließlich in gram-positiven Gattungen wie *Bacillus* (Kralj et al. 2018), *Lactobacillus* (Anwar et al. 2010; Anwar et al. 2008; van Hijum et al. 2002), *Leuconostoc* (Olivares-Illana et al. 2002) und *Streptococcus* (Ponstein und van Leeuwen 1993) gefunden wurden, sind in experimentellen Studien bereits erfolgreich für die Produktion von Inulin und I-FOS eingesetzt worden (Ni et al. 2019).

## 1.3 Definition und Wirkung von Präbiotika und Probiotika

I-FOS werden offiziell als Präbiotika eingestuft (Gibson et al. 1995). Nach der aktuellen wissenschaftlichen Konsensdefinition sind Präbiotika Verbindungen, die bei der Aufnahme oder Applikation durch den Wirt zwei Aspekte aufweisen müssen: Präbiotika müssen eine positive physiologische Wirkung auf den Wirt haben, die zumindest teilweise auf die Verwertung der Verbindung durch Wirtsmikroorganismen zurückzuführen ist. Präbiotische Substanzen dürfen nur eine begrenzte Gruppe von Mikroorganismen beeinflussen und nicht das gesamte betroffene mikrobielle Ökosystem, wodurch das Kriterium der "selektiven" Nutzung erfüllt wird (Gibson et al. 2017). Die am häufigsten untersuchten Präbiotika sind I-FOS, Inulin, Galacto-Oligosaccharide (GOS) sowie Oligosaccharide aus Humanmilch (HMO) (Gibson et al. 2017).



Auch GOS und HMO's sind wie Fructane Ballaststoffe, die allesamt nicht von Säugetieren verdaut werden können und bei Verzehr im Darm von Mikroorganismen fermentiert werden (Gibson et al. 1995). Durch die selektive Nutzung der im Darm wirksamen Präbiotika als Substrat von Darmmikroorganismen, wird die Zusammensetzung, Diversität und Aktivität der Darmmikrobiota moduliert. Das Wachstum von gesundheitsförderlichen Bakterien wird durch Präbiotika stimuliert. In früheren Studien wurde hierbei besonderer Wert auf die Wachstumsförderung von Bakterien der Gattung *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* gelegt. Der „bifidogenen Effekt“, also die signifikante Erhöhung des Anteils an Bifidobakterien, wurde für zahlreiche Präbiotika wie Inulin und I-FOS durch auf Bakterienkulturen basierenden Studien belegt (Gibson et al. 2017). Des Weiteren wird durch die Fermentation der Präbiotika im Darm die Produktion der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA's) Acetat, Propionat und Butyrat erhöht. SCFA's sind Endprodukte der anaeroben Metabolisierung von komplexen Kohlenhydraten im Darm. Diese SCFA's sind für die Darmgesundheit von entscheidender Bedeutung, wobei die verschiedenen Komponenten unterschiedliche Funktionen erfüllen. Zusammengefasst haben diese organischen Säuren entzündungshemmende und immunmodulierende Wirkungen, führen zu einer Verbesserung der Darmbarrierefunktion und haben Bedeutung bei der Modulation der Darm-Homöostase und der Funktion der Kolonocyten (Gibson et al. 2017).

Präbiotika wurden auf verschiedene gesundheitliche Wirkungen hin untersucht, z. B. Verringerung von Infektionen, kardiometabolische Gesundheit, Verfügbarkeit von Mineralien und Immunmodulation (Gibson et al. 2017).

Präbiotika sind abzugrenzen von Probiotika. Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen (Hill et al. 2014). Unter anderem bei Antibiotika-assoziiertes Diarrhöe, Reizdarmsyndrom und *Helicobacter pylori*-Infektionen konnte die Einnahme von spezifischen probiotischen Stämmen zu einer Besserung führen (Sánchez et al. 2017). Probiotische Mikroorganismen wurden primär aus dem Darm oder traditionellen fermentierten Lebensmitteln isoliert. Die am häufigsten eingesetzten Probiotika sind bestimmte Stämme der Gattung *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* sowie die Hefe *Saccharomyces boulardii* (Sánchez et al. 2017). Probiotika üben ihre positive Wirkung auf den Wirt über vier Hauptmechanismen aus: Beeinträchtigung potenzieller Krankheitserreger, Verbesserung der Barrierefunktion des Darms, Immunmodulation und Produktion von Neurotransmittern (Sánchez et al. 2017). Eine Veränderung der Darmmikrobiota erfolgt oft nicht, da die meistbenutzten Probiotika nicht in der Lage sind, sich im Darm anzusiedeln und so nach der probiotischen Intervention wieder ausgeschieden werden (Sánchez et al. 2017).

Ursprünglich wurden die ersten Präbiotika und Probiotika entwickelt, um spezifisch auf die im menschlichen Darm vorhandenen Bifidobakterien und Laktobazillen abzielen. Durch die jüngsten Fortschritte in der Forschung zur Zusammensetzung und Funktion der Darmmikrobiota, die durch neue Sequenzierungsmethoden ermöglicht wurden, konnten jedoch eine Vielzahl von kommensalen Darmbakterien identifiziert werden, die potenziell förderlich für die Gesundheit sind (O'Toole et al. 2017). Diese Darmbakterien erhalten aufgrund ihrer Rolle als mögliche Probiotika der nächsten Generation oder als Zielorganismen für Präbiotika verstärkte Aufmerksamkeit in der aktuellen Forschung (Sánchez et al. 2017; Gibson et al. 2017; Krumbeck et al. 2016).

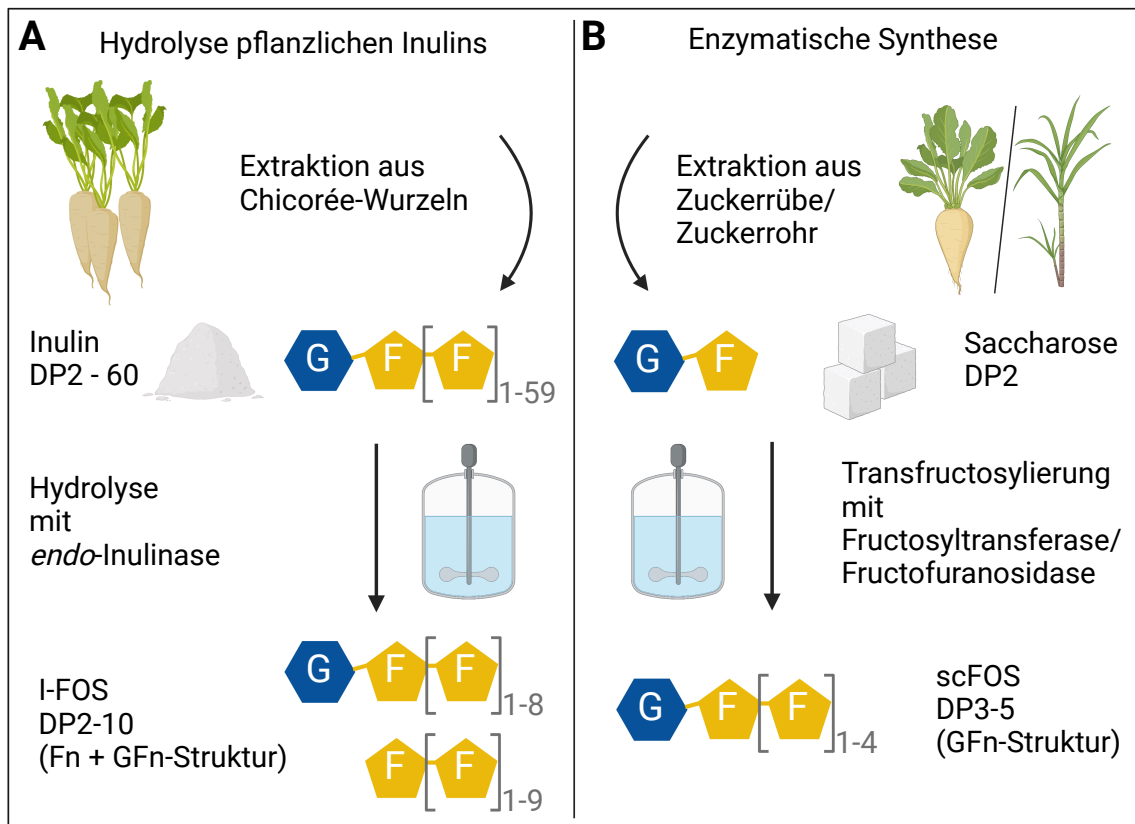
#### **1.4 Medizinisches und wirtschaftliches Interesse an I-FOS**

I-FOS haben aufgrund ihrer präbiotischen und funktionellen Eigenschaften in der Lebensmittelindustrie und im medizinischen Bereich enorm an Bedeutung gewonnen. Es wurde nachgewiesen, dass die regelmäßige Einnahme einer ausreichenden Menge dieser kalorienarmen Ballaststoffe eine positive Auswirkung auf die Zusammensetzung und Aktivität der Darmmikrobiota hat und verschiedene gesundheitliche Vorteile bieten kann (Chen et al. 2016a; Nobre et al. 2022). Unter anderem kann der Verzehr von I-FOS Darmerkrankungen wie akuter Strahlen-Enteritis (Garcia-Peris et al. 2016), Reizdarmsyndrom (Paineau et al. 2008), Morbus Crohn (Joossens et al. 2012; Lindsay et al. 2006) und Dickdarmkrebs (Bornet et al. 2002; Boutron-Ruault et al. 2005) vorbeugen oder lindern. Der Verzehr von I-FOS hat eine aktivierende Wirkung auf das Immunsystem (Bunout et al. 2004; Delgado et al. 2012; Fukasawa et al. 2007; Nakamura et al. 2004) und verbessert die Mineralstoffaufnahme im Darm (de Cassia Freitas et al. 2012; Lobo et al. 2014; Lobo et al. 2006; Wang et al. 2010; Yan et al. 2019). Es gibt auch Untersuchungen über den positiven Einfluss von I-FOS auf psychische und neuropsychiatrische Erkrankungen wie Depressionen (Chi et al. 2020) und Alzheimer (Chen et al. 2017a; Sun et al. 2019).

Eine gesunde Ernährung ist für Verbraucher von wachsendem Interesse. Da diverse Nutzpflanzen wie beispielsweise Weizen, Roggen, Zwiebel, Knoblauch und Bananen Fructane und so auch I-FOS enthalten, nehmen Europäer etwa 3 – 11 g I-FOS täglich mit der Nahrung zu sich (Flamm et al. 2001; Loo et al. 1995; Miremadi und Shah 2012). Aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung werden I-FOS jedoch auch zunehmend in Lebensmitteln eingesetzt, als Nahrungsergänzungsmittel angeboten oder in Viehfutter verwendet. Außerdem werden sie aufgrund ihrer ansprechenden organoleptischen Eigenschaften, ihres Füllstoffgehalts und ihrer Süßkraft verschiedenen Lebensmitteln und Getränken zugesetzt (Nobre et al. 2022).

## 1.5 Industrielle I-FOS-Produktion

Aufgrund der vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten werden I-FOS in industriellem Maßstab für den Weltmarkt produziert, wobei zwei Herstellungswege angewendet werden (Abb. 2). Eine der aktuellen Produktionsstrategien für die kommerzielle I-FOS-Produktion ist die Hydrolyse von Inulin, das zuvor aus Pflanzen extrahiert wurde (Abb. 2, Choukade und Kango 2021; Sánchez-Martínez et al. 2020). Pflanzliches Inulin ist eine Mischung aus Fructan-Molekülen mit einem Polymerisationsgrad (DP) von etwa 2-60 (Kumar et al. 2018). I-FOS sind zwar auch in verschiedenen Pflanzen enthalten, allerdings ist deren Gewinnung aufgrund ihrer geringen Konzentration und saisonalen Limitierungen ökonomisch nicht sinnvoll (Meyer et al. 2015). Pflanzliches Inulin wird vornehmlich aus den Wurzeln des Chicorées (*Cichorium intybus*), welche anteilig am Frischgewicht ca. 15-20 % Inulin enthalten, mit heißem Wasser extrahiert und durch Sprühtrocknungsverfahren gereinigt (Choukade und Kango 2021; Kumar et al. 2018). *Endo*-Inulinasen (EC.3.2.1.7) katalysieren die zufällige Spaltung der glycosidischen Bindungen von Inulin und werden zur teilweisen Hydrolyse des pflanzlichen Inulins zu I-FOS-reichen Sirups eingesetzt (Kumar et al. 2018). Die auf diese Weise erzeugten I-FOS besitzen einen DP von 2-10 mit einem durchschnittlichen DP von 4 (Kumar et al. 2018). Aufgrund ihrer Herkunft bestehen die meisten dieser Oligosaccharide ausschließlich aus Fructose-Einheiten (Fn-Struktur) (Kumar et al. 2018). Die zweite bedeutende Strategie für die industrielle Produktion von I-FOS ist die direkte Synthese von I-FOS aus Saccharose oder Saccharose-reichen Agrarabfällen in biotechnologischen Verfahren (Abb. 2). Hierfür werden Fructosyltransferasen oder Fructofuranosidasen ( $\beta$ -Fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) aus filamentösen Pilzen wie *Aspergillus* sp. oder *Aureobasidium pullulans* verwendet, die sogenannte *short-chain* FOS (scFOS) produzieren. Häufig werden nicht aufgereinigte Enzyme sondern ganze Zellen eingesetzt (Sánchez-Martínez et al. 2020; Nobre et al. 2022, Sangeetha et al. 2005). Bei scFOS handelt es sich um I-FOS mit einem DP von 2-10 (GFn-Struktur), wobei die Hauptprodukte GF2, GF3 und GF4 sind (Sánchez-Martínez et al. 2020). In den meisten Fällen werden nur scFOS bis zu einem DP von 5 synthetisiert (Charoenwongpaiboon et al. 2018). Neben I-FOS des GFn-Typs produzieren die Enzyme der Pilze auch L-FOS, neo-FOS, Fn-Typ I-FOS und das Saccharose-Isomer Blastose in kleineren Mengen (Nobre et al. 2022).



**Abb. 2. Aktuelle Strategien zur industriellen I-FOS-Produktion. (A)** Inulin wird aus Erzeugerpflanzen wie Chicorée extrahiert und in einem biotechnologischen Verfahren mit Hilfe von *endo*-Inulinase-Enzymen zu I-FOS hydrolysiert. **(B)** scFOS werden mittels Fructosyltransferase- oder Fructofuranosidase-Enzymen aus dem Substrat Saccharose direkt synthetisiert. Abb. erstellt mit BioRender.com.

Die enzymatische Synthese von I-FOS aus Saccharose hat mehrere Vorteile gegenüber der Pflanzenextraktionsmethode. Die Menge und der DP des Pflanzeninulins variieren je nach Anbau und Wachstumsbedingungen der Erzeugerpflanzen, was zu einer unterschiedlichen Produktzusammensetzung führt (Flores et al. 2016). Die Verarbeitung des Pflanzenmaterials nach der Ernte beeinflusst ebenfalls die Kettenlänge der isolierten Fructane (Mensink et al. 2015). Darüber hinaus ist ein Fructan-Abbau am Ende der Wachstumsperiode und während der Lagerung möglich, da die Pflanzen das Inulin hydrolysierende Enzym Fructan-1-Exohydrolase (EC 3.2.1.153) produzieren (Mutanda et al. 2014). Außerdem sind die notwendigen Verfahren zur Verarbeitung des Pflanzenmaterials langwierig und kostspielig (Ni et al. 2019; Choukade und Kango 2021). Im Gegensatz dazu liefert die biotechnologische Herstellung von I-FOS aus Saccharose ein Produkt mit gleichbleibender Qualität und kann saison- und standortunabhängig durchgeführt werden (Wada et al. 2003). Ein weiterer Vorteil ist, dass Saccharose ein weit verbreitetes und preiswertes Substrat ist (Xu et al. 2018). Insgesamt ist die direkte I-FOS-Synthese aus Saccharose

kostengünstiger (Sánchez-Martínez et al. 2020) und verdrängt nach und nach die Extraktionsmethoden aus Pflanzen (Choukade und Kango 2021).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Trotz der erfolgreichen industriellen Synthese von I-FOS aus Saccharose mittels pilzlicher Enzyme gibt es noch immer erhebliche Möglichkeiten für Verbesserungen (Choukade und Kango 2021). Die hohen Kosten der I-FOS-Produktion schränken eine breitere Anwendung von I-FOS ein, weshalb es nach wie vor von Interesse ist, neue biotechnologische Produktionsstrategien zu erschließen (Choukade und Kango 2021, Nobre et al. 2022).

Aus diesem Grund war es ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob in einer alternativen Produktionsstrategie mit der bakteriellen Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 hochkonzentrierte I-FOS auf möglichst ertragreiche und effiziente Weise produzieren werden können. Kernziel war es, die I-FOS-Ausbeute und die Effizienz des Produktions-Prozesses zu erhöhen. Zunächst sollte jedoch als Grundlage für die Evaluation der I-FOS-Synthese eine isokratische HPLC-Methode etabliert werden, die die schnelle, hochauflösende Analyse und Quantifizierung von Mono- und Disacchariden sowie kurz- und langkettiger I-FOS ermöglicht. Schließlich sollte ein geeignetes Protokoll zur Aufreinigung der produzierten I-FOS mittels Aktivkohle entwickelt werden um diese im Anschluss als Substrat in Wachstumsexperimenten mit Darmbakterien einsetzen zu können.

Neuere Studien haben gezeigt, dass neben Bifidobakterien und Bakterien der Gattung *Lactobacillus* eine große Bandbreite an kommensalen Darmbakterien Fructane als Wachstums-Substrat nutzen können. Darunter sind sowohl Bakterien die als gesundheitsförderlich gelten, als auch Bakterien, die als gesundheitsschädigend gelten (Adamberg et al. 2015; Mao et al. 2015; Scott et al. 2014). In zahlreichen Studien zu präbiotischen Interventionen wurde zudem eine hohe interindividuelle Variabilität der Wirkung sowie Non-Responder-Studienteilnehmer beobachtet, was das Ergebnis von präbiotischen Interventionen zurzeit unvorhersehbar macht (Krumbeck et al. 2016). Es wird vermutet, dass die Wirkung von Präbiotika von verschiedenen Umwelt- und Wirtsfaktoren abhängt, darunter die Zusammensetzung und Funktionalität der Darmmikrobiota vor Beginn der Intervention (Gibson et al. 2017; Krumbeck et al. 2016). Die Metabolisierung von Fructanen im Darm ist demnach noch nicht hinreichend untersucht und ein tiefergehendes Verständnis zur Wirkungsweise von Fructanen ist nötig, um diese gezielt und mit dem gewünschten Resultat als Präbiotikum einsetzen zu können (Mao et al. 2015).

Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit polymere Fructane und FOS des Inulin- und Levan-Typs, einschließlich der zuvor produzierten und aufgereinigten I-FOS, als Substrate in Wachstumsversuchen mit einigen kommensalen, häufig vorkommenden Bakterien der menschlichen Darmflora eingesetzt. Anhand der Wachstumsversuche sollte vergleichend untersucht werden, inwieweit die Fähigkeit zur Verstoffwechslung der unterschiedlichen Fructane in den kommensalen Darmbakterien vertreten ist. Des Weiteren sollte analysiert werden, wie gut die unterschiedlichen Fructane von den Darmbakterien metabolisiert werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien und andere Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die chromatographischen FOS-Standards 1-Kestotriose, 1,1-Kestotetraose, 1,1,1-Kestopentaose, Levanbiose sowie Levantriose wurden von Megazyme (Bray, Irland) bereitgestellt. Die Chemikalien besaßen mindestens die Qualitätsstufe *per analysis* (p. a.).

#### 2.1.2 Gase

Es wurden die Gase CO<sub>2</sub> (99,9 %), H<sub>2</sub> (99,9 %) und N<sub>2</sub> (99,9 %) im technischen Reinheitsgrad von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

#### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Die Konzentration des zur Kultivierung von *E. coli* verwendeten Antibiotikums Carbenicillin, sowie die Konzentration der zur Proteinproduktion benötigten Anhydrotetrazyklin-Lösung (AHT-Lösung), ist in Tabelle 1 zu finden.

**Tabelle 1. Carbenicillin- und AHT-Lösung.**

	Lösungsmittel	Zusammensetzung	Endkonzentration im Medium
Carbenicillin <sup>a)</sup>	50 % [v/v] Reinst-EtOH	100 mg mL <sup>-1</sup>	100 µg mL <sup>-1</sup>
AHT <sup>a)</sup>	50 % [v/v] Reinst-EtOH	2 mg mL <sup>-1</sup>	200 ng mL <sup>-1</sup>

<sup>a)</sup>Sterilfiltriert

Die Zusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer sind Tabelle 2 zu entnehmen. Zur Herstellung des Puffers zur enzymatischen Hydrolyse von polymeren Fructanen (Kapitel 2.8.2), wurde 100 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 4,6 (Tabelle 2) mit 1 mg mL<sup>-1</sup> Rinderserumalbumin (BSA) versetzt.

**Tabelle 2. Verwendete Puffer<sup>a)</sup>.**

	Substanz	Konzentration
10x Puffer W	Tris-HCl	1 M
	NaCl	1,5 M
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 100 mL
	HCl	→ pH 8
Bis-Tris-Puffer <sup>b)</sup>	Bis-Tris	1 M
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 10 mL
	HCl	→ pH 6,5; 7,0
Natrium-Acetat-Puffer	Natrium-Acetat	1 M
	Essigsäure 100 % [v/v]	1 M
1-M-Stammlösungen zum Einstellen der pH-Werte zu verschiedenen Anteilen mischen		→ pH 3,5; 4,0; 4,5; 4,6; 5,0; 5,5
Kaliumphosphat-Puffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M
1-M-Stammlösungen zum Einstellen der pH-Werte zu verschiedenen Anteilen mischen		→ pH 5,5; 6,0; 7,0; 8,0
Citronensäure-Natriumphosphat-Puffer	Citronensäure-Monohydrat	1 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M
1-M-Stammlösungen zum Einstellen der pH-Werte zu verschiedenen Anteilen mischen		→ pH 2,5; 3,0; 3,5

<sup>a)</sup>Alle Puffer wurden in H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> angesetzt und bei 4 °C gelagert.

<sup>b)</sup>Anaerobisiert, autoklaviert (Kapitel 2.4.3)

## 2.2 Organismen und Plasmide

### 2.2.1 Organismen

Zur Produktion der Inulosucrase wurde der in Tabelle 3 beschriebene *E. coli* BL21- Stamm der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA) verwendet.

**Tabelle 3. Verwendeter *E. coli* BL21-Stamm.**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	New England Biolabs (Ipswich, USA)

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit verwendeten Darmbakterien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen (Tabelle 4).



**Tabelle 4. Verwendete Bakterien der menschlichen Darmmikrobiota.**

Stamm <sup>a)</sup>	Referenz
<i>Agathobacter rectalis</i> DSM 17629	(Rosero et al. 2016)
<i>Bacteroides intestinalis</i> DSM 17393	(Bakir et al. 2006; Hahnke et al. 2016)
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> DSM 18836	(Chassard et al. 2008)
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	(Moore et al. 1976)
<i>Collinsella intestinalis</i> DSM 13280	(Kageyama undvBenno 2000; Nouioui et al. 2018)
<i>Dorea formicigenerans</i> DSM 3992	(Holdeman und Moore 1974; Taras et al. 2002)
<i>Faecalibacterium duncaniae</i> DSM 17677	(Sakamoto et al. 2022)
<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	(Hahnke et al. 2016; Sakamoto et al. 2007)
<i>Phocaeicola vulgatus</i> DSM 1447	(Eggerth und Gagnon 1933; García-López et al. 2019)
<i>Segatella copri</i> DSM 18205	(Hayashi et al. 2007; Hitch et al. 2022)
<i>Ruminococcus gnavus</i> DSM 108212	(Moore et al. 1976)

<sup>a)</sup>Alle Bakterien entsprachen Wildtyp-Stämmen.

### 2.2.2 Plasmid

Das verwendete Plasmid pASK3\_InuGB-V3 (Tabelle 5) wurde in *E. coli* BL21 transformiert zur Produktion der rekombinanten Inulosucrase genutzt.

**Tabelle 5. Verwendetes Plasmid.**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pASK3_InuGB-V3	Derivat des pASK-IBA3-Plasmids (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland); trägt das Gen <i>inuGB-V3</i> : Ein Sequenzabschnitt von Nukleotid 109 – 2097 des Inulosucrase-Gens <i>inuGB</i> aus <i>L. gasseri</i> DSM 20604 (GenBank accession: ACZ6728.1); C-terminal Strep-tag II; Amp <sup>R</sup> , <i>tet</i> -promoter	Wienberg et al. 2019

## 2.3 Software

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Computer-Programme sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6. Verwendete Software.**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Quelle
BioRender Premium	Online-Tool zur Erstellung von Abbildungen	Science Suite Inc. (Toronto, Kanada); www.biorender.com
ChromQuest 5.0	Steuerung der chromatographischen Systeme	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
GraphPad Prism 9.5.1	Graphische Daten-Darstellung und Regressionsanalysen	Graphpad Software, Inc. (Boston, USA)

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Quelle
i-control 1.5.14.0	Steuerung des Mikrotiterplatten-Lesegerätes	Tecan Austria GmbH (Grödig, Österreich)
Microsoft Office 365	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung, Erstellung von Abbildungen	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
SnapGene 1.1.3	Erstellung von Plasmidkarten	GSL Biotech LLC (San Diego, USA)
UCSF ChimeraX 1.6.1	Analyse und Visualisierung von Protein-Kristallstrukturen	Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics; University of California (San Francisco, USA). Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; National Institutes of Health (Rockville, USA)
Zotero 6.0.23	Literaturverwaltung und Zitationsmanagement	Roy Rosenzweig Center for History and New Media; George Mason University (Fairfax, USA)

## 2.4 Mikrobiologische Methoden

### 2.4.1 Sterilisation der Medien und Medienbestandteile

Vor Verwendung wurden alle Medien und Zusätze sterilisiert. Hierfür wurden die Medien bzw. Medienbestandteile bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Medienbestandteile und Zusätze, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden mit sterilen 0,22 µm PES-Filtern sterilfiltriert.

### 2.4.2 Kultivierung von *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3

**Tabelle 7. Für *E. coli* verwendete Kulturmedien.**

	Substanz	Menge
LB-Medium <sup>a)</sup>	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 mL
TB-Medium	Trypton/Pepton	12 g
	Hefeextrakt	24 g
	Glycerin	5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 900 mL
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54 g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 100 mL
	→ Phosphatpuffer getrennt autoklaviert	

<sup>a)</sup>Es wurden 25 g L<sup>-1</sup> FertigmEDIUM (granuliert) verwendet (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Wenn nicht anders angegeben, wurde *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 aerob bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator angezogen.

Für die Stammerhaltung wurde Lysogeny-Broth-Medium (LB-Medium, Miller 1972) verwendet (Tabelle 7). Zum Zwecke der heterologen Proteinproduktion wurde *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 in Terrific-Broth-Medium (TB-Medium) kultiviert (Tabelle 7). Zur Erhaltung des pASK3\_InuGB-V3-Plasmids wurde den Medien stets 100 µg mL<sup>-1</sup> Carbenicillin (Tabelle 2) zugesetzt.

### 2.4.3 Kultivierung der Darmbakterien

Alle Darmbakterien (Tabelle 4) wurden bei 37 °C unter anoxischen Bedingungen kultiviert. Es wurden die Komplexmedien PY-(Tabelle 8, 9), TPY-(Tabelle 8, 9) und YCFA-Medium (Tabelle 10) sowie das synthetische Defined-Mineral-Medium (DM-Medium, Tabelle 9, 11) verwendet.

**Tabelle 8. PY- und TPY-Medium.**

	Substanz	PY-Medium Menge	TPY-Medium Menge
PY- und TPY-Medium	Trypton/Pepton aus Casein	5 g	2,5 g
	Pepton aus Soja	5 g	2,5 g
	Hefeextrakt	10 g	5 g
	Fleischextrakt	5 g	2,5 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	2 g
	Salzlösung	40 mL	40 mL
	Resazurin-Lösung	1 mL	1 mL
	Tween 80 <sup>a)</sup>	1 mL	1 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 mL	ad 1000 mL
	KOH	→ pH 8	→ pH 8

<sup>a)</sup>Nur bei Kultivierung von *C. intestinalis*.

Nach dem Ansetzen wurden die Medien in dickwandige Serumflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden, Deutschland) aliquotiert. Anschließend wurden die Medien 10 min mit N<sub>2</sub> und mit einem 80 % N<sub>2</sub> / 20 % CO<sub>2</sub>-Gasgemisch durchsprudelt bis der pH-Wert auf 7 gesenkt wurde. Durch die Begasung wurden zum einen der Sauerstoff aus den Medien getrieben. Des Weiteren wurde durch das CO<sub>2</sub> ein Carbonat-Puffersystem eingestellt und eine Ansäuerung erzielt (Kohlensäure). Medien-Bestandteile und -Zusätze wurden lediglich 10 min mit N<sub>2</sub> anaerobisiert. Schlussendlich wurden alle Flaschen luftdicht mit Butyl-Gummistopfen verschlossen und autoklaviert.

**Tabelle 9. Stammlösungen zur Herstellung der Kulturmedien für Darmbakterien.**

Bezeichnung	Substanz	Menge
Resazurin	Resazurin	50 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL

Bezeichnung	Substanz	Menge
FeSO <sub>4</sub> -Lösung	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,278 g
	Konzentrierte HCl	2 Tropfen
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 100 mL
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Salz-Lösung	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
	NaCl	2 g
	NaHCO <sub>3</sub>	10 g
	CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,25 g
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1 L
Spurenelement-Lösung 6 (SL6-Lösung)	ZnSO <sub>4</sub>	0,1 g
	MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,03 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g
	CuCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,01 g
	CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,2 g
	NiCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,02 g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,03 g
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1 L

Tabelle 10. YCFA-Basismedium.

Substanz	Menge
Casitone	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	45 mg
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	90 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,45 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,45 g
NaCl	0,9 g
NaHCO <sub>3</sub>	4 g
Resazurin-Lösung	1 mL
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 mL
(NaOH/HCl)	→ pH 7

Tabelle 11. DM-Medium.

Substanz	Menge
NaHCO <sub>3</sub>	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,2 g
NaCl	0,9 g
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	26 mg
NH <sub>4</sub> Cl	0,75 g
FeSO <sub>4</sub> -Lsg.	1,5 mL
SL6	2 mL
Resazurin	1 mL
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 mL
(NaOH/HCl)	→ pH 8

Vor Verwendung wurden die Medien entsprechend den Bedürfnissen der Bakterien mit Zusätzen (Tabelle 12) supplementiert. In alle Medien wurde L-Cystein (0,5 g L<sup>-1</sup>), Hämin (0,5 mg L<sup>-1</sup>), Wolin (0,1x Endkonzentration), Vitamin K1 (1 µL L<sup>-1</sup>) und Butyrat (2 mM Endkonzentration) hinzugefügt. Das L-Cystein diente als Reduktionsmittel um verbliebenen Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen. Der verbliebene Sauerstoff wurde durch den Redoxindikator Resazurin, welcher in allen Medien enthalten war, sichtbar gemacht. Resazurin besitzt im oxidierten Zustand bei pH 7 eine blaue Farbe. Unter Reduktion wandelt sich die blaue Farbe des Indikators zunächst zu pink um (es entsteht Resofurin) und wird abschließend farblos (es bildet sich Dihydroresofurin). *S. copri-*

Kulturen wurden zusätzlich mit 0,02 % L-Methionin supplementiert. Zur Anzucht von *F. duncaniae* wurde den verwendeten Medien Fettsäure-Mix (10 mL L<sup>-1</sup>) zugegeben.

**Tabelle 12. Medien-Zusätze zur Kultivierung von Darmbakterien.**

Bezeichnung	Substanz	Menge
Vitamin K1 <sup>a)</sup>	Vitamin K1	0,1 mL
	95 % [v/v] Ethanol, reinst	ad 20 mL
Hämin <sup>a) b) c)</sup>	Hämin	50 mg
	1 M NaOH	1 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 100 mL
10x Wolin <sup>a) b) c)</sup>	Biotin	20 mg
	Folsäure	20 mg
	Pyridoxin × HCl	100 mg
	Thiamin × HCl	50 mg
	Na-Riboflavin	50 mg
	Vitamin B12	1 mg
	ρ-Aminobenzoat	50 mg
	α-Liponsäure	50 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 mL
Fettsäuren-Mix <sup>b) c)</sup>	Acetat	500 mM
	Propionat	500 mM
	Butyrat	500 mM
	iso-Butyrat	100 mM
	Valeriat	100 mM
	iso-Valeriat	100 mM
	2-Methylbutyrat	100 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL
	(NaOH/HCl)	→ pH 7
L-Cystein	L-Cystein	12,1 g (2 M)
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL
Butyrat <sup>b) c)</sup>	Butyrat	2 M
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL
	(NaOH/HCl)	→ pH 7,6
L-Methionin <sup>a) b) c)</sup>	L-Methionin	0,2 %
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL
Glucose <sup>b) d)</sup>	Glucose	1,5 M
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL
Fructose <sup>b) d)</sup>	Fructose	1,5 M
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL
Maltose <sup>b) d)</sup>	Maltose	1,5 M
	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 50 mL

<sup>a)</sup>Kurzfristige Lagerung bei 4 °C im Dunkeln

<sup>b)</sup>Anaerobisiert

<sup>c)</sup>Sterilfiltriert

<sup>d)</sup>Autoklaviert

Zur Reaktivierung und Herstellung von Kryokulturen (Kapitel 2.4.6) sowie zur Vorbereitung von Vorkulturen für spätere Versuche erfolgte die Kultivierung der Darmbakterien direkt in den

Serumflaschen ohne Schütteln im Inkubator. Als C-Quelle wurde den Medien 30 mM Glucose zugegeben (Tabelle 12). Nur *C. leptum* wurde nicht mit Glucose, sondern mit 30 mM Maltose angezogen (Tabelle 12).

Zur Reaktivierung von Kryokulturen wurde das reichhaltige PY-Medium oder DM-Medium verwendet. Welches Medium und welche C-Quelle zu diesem Zweck für jedes Darmbakterium genutzt wurden, ist in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13. Verwendetes Medium und C-Quelle zur Kultivierung der Darmbakterien in Serumflaschen zur Reaktivierung von Kryokulturen.**

Darmbakterium	Medium		C-Quelle	
	PYM	DMM	Glucose	Maltose
<i>Agathobacter rectalis</i> DSM 17629	x		x	
<i>Bacteroides intestinalis</i> DSM 17393	x		x	
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> DSM 18836		x	x	
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	x			x
<i>Collinsella intestinalis</i> DSM 13280	x		x	
<i>Dorea formicigenerans</i> DSM 3992	x		x	
<i>Faecalibacterium duncaniae</i> DSM 17677	x		x	
<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	x		x	
<i>Phocaeicola vulgatus</i> DSM 1447		x	x	
<i>Segatella copri</i> DSM 18205	x		x	
<i>Ruminococcus gnavus</i> DSM 108212	x		x	

#### 2.4.4 Kultivierung der Darmbakterien in Mikrotiterplatten zur Bewertung des Wachstums auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

Die Wachstumsversuche von Darmbakterien auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs wurde in 48-Multiwell-Kulturplatten aus Polystyrol mit Deckel (CELLSTAR®, transparent mit flachem Boden, Greiner AG, Kremsmünster, Österreich) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite 200, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) im Triplikат durchgeführt. Um eine anoxische Inkubation zu gewährleisten, befand sich das Mikrotiterplatten-Lesegerät in einer Anaeroben Kammer (Coy Laboratory Products, Inc., Grass Lake, USA) unter CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>-Athmosphäre (49 %/49 %/2 %).

In den Wachstumsversuchen kamen die reduzierten Komplexmedien TPYM und YCFA, sowie DMM zum Einsatz. In welchem Medium die Darmbakterien jeweils angezogen wurden ist Tabelle 14 zu entnehmen.

Als C-Quelle (Tabelle 15) wurden Glucose, Fructose und Maltose (Positiv-Kontrollen) sowie die Fructane I-FOS (in der vorliegenden Arbeit mit InuGB-V3-Rohenzym produziert und aufgereinigt), I-FOS (aus Chicorée-Inulin hydrolysiert, Megazyme, Bray, Irland), Inulin (aus Chicorée, Megazyme,

Bray, Irland), Levan (mit Levansucrase produziert nach Pohlentz et al. 2022, zur Verfügung gestellt von Marcel Hövels) und L-FOS (mit *endo*-Levanase produziert nach Pohlentz et al. 2022, zur Verfügung gestellt von Joana Pohlentz) verwendet, die alle als 0,4 M Stammlösungen angesetzt wurden. Das Inulin musste aufgrund seiner geringen Löslichkeit vor Benutzung im Wasserbad (80 °C, 2 min) gelöst werden.

**Tabelle 14. Zuordnung Darmbakterien und Medien Wachstumsversuche Mikrotiterplatten.**

Darmbakterium	Medium			Bis-Tris-Puffer	
	TPYM	YCFA	DMM	pH6,5	pH 7
<i>Agathobacter rectalis</i> DSM 17629	x			x	
<i>Bacteroides intestinalis</i> DSM 17393			x		x
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> DSM 18836			x		x
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	x			x	
<i>Collinsella intestinalis</i> DSM 13280	x				x
<i>Dorea formicigenerans</i> DSM 3992	x			x	
<i>Faecalibacterium duncaniae</i> DSM 17677		x			x
<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	x			x	
<i>Phocaeicola vulgatus</i> DSM 1447			x		x
<i>Segatella copri</i> DSM 18205	x				x
<i>Ruminococcus gnavus</i> DSM 108212	x			x	

**Tabelle 15. In den Wachstumsversuchen von Darmbakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs verwendete Substrate.**

Substrat	Ursprung	Quelle
Glucose <sup>a)</sup>	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fructose <sup>a)</sup>	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Maltose <sup>a)</sup>	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
I-FOS (InuGB-V3) <sup>b)</sup>	bakteriell, InuGB-V3 aus <i>L. gasseri</i>	Diese Arbeit
I-FOS (Chicorée) <sup>b)</sup>	Chicorée, hydrolysiertes Inulin	Megazyme (Bray, Irland)
Inulin <sup>b)</sup>	Chicorée	Megazyme (Bray, Irland)
L-FOS <sup>b)</sup>	bakteriell, <i>endo</i> -Levanase aus <i>A. chroococcum</i> (Pohlentz et al. 2022)	z. Verfügung gestellt v. Joana Pohlentz
Levan <sup>a)</sup>	bakteriell, Levansucrase aus <i>G. japonicus</i> (Pohlentz et al. 2022)	z. Verfügung gestellt v. Marcel Hövels

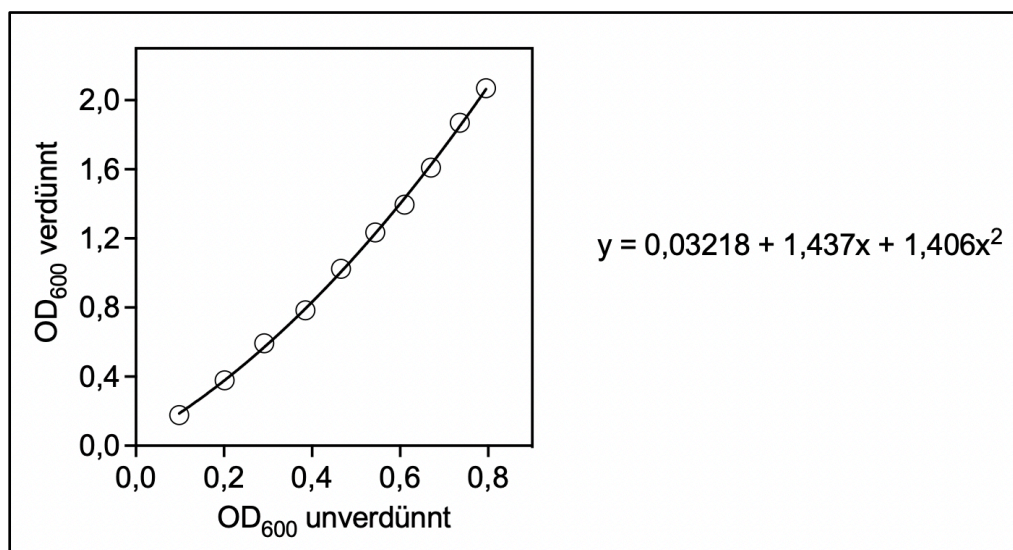
<sup>a)</sup>Autoklaviert, anaerobisiert, Lagerung bei Raumtemperatur

<sup>b)</sup>Sterilfiltriert, aerob, Lagerung bei -20 °C

Pro Well wurde mit einem Endvolumen von 600 µL das Kulturmedium (mit Zusätzen s. oben) mit 30 mM der C-Quelle und 100 mM Bis-Tris-Puffer vermischt. Mit Hilfe des Bis-Tris-Puffers wurde der pH-Wert auf pH 6,5 bzw. pH 7 eingestellt (Tabelle 2). Den Negativkontrollen wurde H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> anstatt C-Quelle zugegeben. Zum Starten der Kultivierung wurden die Medien wurden mit 20 µL einer gut gewachsenen Vorkultur (in gleichem Medium angezogen, Kapitel 2.4.3) angeimpft. Das Wachstum erfolgte im Mikroplatten-Lesegerät bei 37 °C. Alle 5-10 min wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) in 5 Blitzen gemessen, nachdem die Platte für 120 s mit einer

Amplitude von 3 mm linear geschüttelt worden war. Die Rand-Wells der Mikrotiterplatte wurden aufgrund hoher Verdunstung nicht für Kultivierungen verwendet, sondern mit Wasser gefüllt.

Da durch die direkte Messung der  $OD_{600}$  in den Mikrotiterplatten bei hohen Zelldichten eine Verfälschung der  $OD_{600}$  aufgrund von mehrfacher Lichtstreuung nicht vermieden werden konnte, wurden für jeden Bakterienstamm Kalibrierkurven erstellt, wie dies beispielhaft für *P. johnsonii* dargestellt ist (Abb. 3). Mit der Hilfe der Kalibrierkurven konnten die vom Mikrotiterplatten-Lesegerät erfassten  $OD_{600}$ 's auf Werte normalisiert werden, die Messungen von verdünnten Zellsuspensionen in einem Photometer entsprachen. Zur Erstellung der Kalibrierkurven wurde für jeden Bakterienstamm eine Reihe an Zellsuspensionen mit steigender Dichte angelegt. Zur Anzucht der hierfür benötigten Zellen, sowie auch für alle Verdünnungen und zur Messung der Leerwerte wurde das gleiche Medium verwendet wie in den Wachstumsexperimenten in den Mikrotiterplatten (Tabelle 14).



**Abbildung 3. Kalibrierkurve zur Normalisierung der  $OD_{600}$  von *P. johnsonii*.** Proben einer *P. johnsonii*-Kultur (in TPY-Medium angezogen) wurden mit TPY-Medium zu Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Zelldichten verdünnt. Die  $OD_{600}$  der Zellsuspensionen wurde unverdünnt im Mikroplatten-Lesegerät, sowie nach Verdünnung auf eine  $OD_{600}$  von  $\leq 0,3$  im Tischphotometer ausgelesen. Das anhand der Daten berechnete Quadratische Polynom mit der Gleichung  $y = 0,03218 + 1,437x + 1,406x^2$  wurde zur Normalisierung der gemessenen  $OD_{600}$ 's in den Wachstumsversuchen auf verschiedenen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs verwendet.

Die  $OD_{600}$  der unverdünnten Zellsuspensionen (600  $\mu$ L) wurde in einer 48-Well-Mikrotiterplatte im Mikroplatten-Lesegerät gemessen (Kapitel 2.4.5). Des Weiteren wurden die  $OD_{600}$  der Zellsuspensionen an einem gängigen Tischphotometer gemessen, nachdem die Proben entsprechend verdünnt wurden (Kapitel 2.4.5). Die verdünnten  $OD_{600}$ -Werte (Photometer) wurden



gegen die verdünnten OD<sub>600</sub>-Werte (Mikroplatten-Lesegerät) aufgetragen und durch die Daten-Werte wurde eine quadratische Regression gelegt (Auswahl im Datenanalyse-Programm GraphPad Prism (Tabelle 6): Nonlinear fit (second order polynomial, quadratic)) (Abb. 3). Mit Hilfe der erstellten Gleichung des Quadratischen Polynoms ( $y = B_0 + B_1x + B_2x^2$ ) konnten die OD<sub>600</sub>-Werte der Wachstumsversuche normalisiert werden.

#### 2.4.5 Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von Bakterienkulturen

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde über die Bestimmung der OD<sub>600</sub> analysiert. Bei der Wellenlänge von 600 nm wird die durch die in Suspension befindlichen Bakterienzellen hervorgerufene Lichtstreuung kaum durch Lichtabsorption verfälscht. Je 0,8 - 1 mL der Bakteriensuspensionen wurden in eine Kunststoffküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gegeben. Die OD<sub>600</sub>-Messung erfolgte in einem Tischphotometer. Als Leerwert (Blank) wurde das jeweilige Medium verwendet. Bei einer zu hohen Zellzahl kommt es bei der OD<sub>600</sub>-Messung zu einer mehrfachen Streuung des Lichtes, sodass die OD<sub>600</sub>-Werte verfälscht werden. Um eine Mehrfachstreuung zu verhindern, wurden die Proben ab einer OD<sub>600</sub> von 0,3 mit Medium verdünnt. Da die Proben bei der OD<sub>600</sub>-Messung Sauerstoff ausgesetzt wurden, musste eine Verfälschung der OD<sub>600</sub>-Werte aufgrund des Redoxindikators Resazurin verhindert werden. Proben von anaeroben Kulturen der Darmbakterien wurden deshalb mit einigen Krümeln Natriumdithionit vermischt. Natriumdithionit besitzt eine starke Reduktionswirkung, wodurch die Oxidation und somit auch ein Farbumschlag des in anaeroben Medien enthaltenen Resazurins verhindert wurde.

#### 2.4.6 Stammerhaltung der verwendeten Bakterien

Die kurzfristige Lagerung der verschiedenen Bakterien-Kulturen erfolgte bei 4 °C. Mit diesen Kulturen wurde regelmäßig frisches Medium angeimpft, um neue Kulturen zu erhalten. Zur langfristigen Stammerhaltung wurden Kryokulturen angelegt und bei -70 °C gelagert.

Die Kryokulturen von *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 wurden hergestellt, indem 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl 99,5 % Glycerin (steril) vermischt, in Kryoröhrchen überführt und zügig bei -70 °C eingefroren wurden.

Zur langfristigen Lagerung der anaeroben Darmbakterien wurden zunächst 2 ml 50 % [w/v] Saccharose in kleinen Serumflaschen mit Butyl-Gummistopfen durch Begasung mit N<sub>2</sub> anaerobisiert und anschließend autoklaviert. Zur Saccharose wurden das gleiche Volumen einer gut gewachsenen Kultur des gewünschten Darmbakteriums gegeben, durch schütteln vermischt und bei -70 °C eingefroren. Zur Reaktivierung der anaeroben Kryokulturen wurden diese auf Eis unter steriler N<sub>2</sub>-Begasung aufgetaut und anschließend als Inokulum in frisches Medium gegeben.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Heterologe Produktion des InuGB-V3-Rohenzym in *E. coli* BL21

Die rekombinante Variante der Inulosucrase InuGB aus *L. gasseri* DSM 20604 mit der Bezeichnung InuGB-V3 (GenBank-Hinterlegung: ACZ6728.1, Wienberg 2019) wurde heterolog in *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 produziert. Für die alle Kultivierungen wurde TB-Medium verwendet. Zunächst wurden Übernachtskulturen des Produktionsstammes angelegt. Die Zellen wurden geerntet (5.000 x g, 3 min), in frischem Medium resuspendiert und zur Beimpfung von 1 L Kulturmedium in 2 L Erlenmeyerkolben (1 % [v/v]) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 180 rpm bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 - 0,4 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression des *inuGB-V3*-Gens durch Zugabe von 200 ng AHT pro mL Kultur induziert. Die Proteinproduktion wurde ü. N. (21 h) bei 25 °C und 150 rpm durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen geerntet (8.000 x g, 15 min, 4 °C), in 20 mL 4 °C kaltem Puffer W resuspendiert und mit 10 µL Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt. Dann wurden die Zellen mittels Ultraschalls für 2 min pro mL Zellsuspension lysiert. Hierfür wurde der Branson Sonifier Cell Disruptor sowie der Branson Ultra Sonics Konverter (Ultrasonics Corporation Brookfield, USA) mit einer Output-Intensität von 7 und einem 50 %igem Pulsintervall verwendet. Die Zellsuspension wurde während des Vorgangs auf 4 °C gekühlt (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ, DEU). Die Zell-Lyse durch Ultraschall basiert darauf, dass die Hochfrequenz-Schallwellen des Ultraschallgerätes Kavitationskräfte auslösen, die die Zellen aufbrechen, sodass das intrazelluläre Material freigesetzt wird. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15.000 x g, 15 min, 4 °C) aus dem Zell-Lysat entfernt, welches im Anschluss mit der gleichen Menge Glycerin (99,5 %) vermischt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert wurde. Auf diese Weise konnten etwa 40 mL InuGB-V3-reicher Zellextrakt (im Folgenden als InuGB-V3-Rohenzym bezeichnet) pro Liter Kultur gewonnen werden. Die Proteinproduktion wurde im Triplikat durchgeführt. Der Zellextrakt einer nicht-induzierten Kultur diente als Kontrolle der Proteinproduktion.

### 2.5.2 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Um den Gehalt an InuGB-V3 in den Rohextrakten zu bestimmen und um aufgereinigtes Enzym zu erhalten, wurde das mit einem Strep-Tag II versehene Enzym aus Aliquots der InuGB-V3-reichen Zellextrakte mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie beruht auf der starken Interaktion zwischen Strep-Tactin, einem Derivat des Proteins Streptavidin, und Biotin bzw. dem Strep-Tag II (Aminosäuresequenz WSH PQFEK). In der vorliegenden Arbeit wurde das Säulenmaterial Strep-

Tactin<sup>®</sup>XT 4Flow<sup>®</sup> (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland) in Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatographie-Säulen (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Bei Strep-Tactin<sup>®</sup>XT 4Flow<sup>®</sup> handelt es sich um Agarose-Beads, an die das Strep-Tactin<sup>®</sup>XT gekoppelt ist. Wird Zellextrakt über das Säulenmaterial gegeben, binden darin enthaltene Proteine mit Strep-Tag hochselektiv an das Strep-Tactin<sup>®</sup>XT. In dieser Arbeit wurde ein Säulenbett-Volumen von 0,4 mL Strep-Tactin<sup>®</sup>XT verwendet, über das ein Zellextrakt-Volumen von 1 mL gegeben wurde. Zum Schutz des Enzyms wurden alle Puffer vorgekühlt und die Arbeit erfolgte bei 4 °C. Nicht gebundene Proteine und andere Substanzen wurden mit 5 mL Puffer W von der Säule gewaschen. Im Anschluss wurde das gebundene Protein in fünf Schritten (E1 = 0,2 mL, E2 = 0,6 mL, E3 = 0,5 mL, E4 = 0,5 mL, E5 = 0,2 mL) von der Säule eluiert. Der für die Elution verwendete BXT-Puffer (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Deutschland) enthielt Biotin, welches kompetitiv am Strep-Tactin<sup>®</sup>XT bindet, sodass gebundene Proteine eluiert werden. Die Elutionsfraktionen wurden mit dem gleichen Volumen Glycerin (99,5 %) vermischt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Abschließend wurde das Säulenmaterial mit 10 mL 10 mM NaOH regeneriert, da das Biotin durch NaOH vom Strep-Tactin<sup>®</sup>XT verdrängt werden kann.

### 2.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) mit Roti<sup>®</sup>-Quant-Reagenz (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Dieser kolorimetrische Test basiert darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 mit den hydrophoben und kationischen Seitenketten von Proteinen starke, nicht-kovalente Bindungen eingeht. Im Reagenz liegt der Farbstoff aufgrund des sehr niedrigen pH-Wertes des Reagenzes in kationischer, rot-grüner Form vor. Die Bildung des Protein-Farbstoff-Komplexes stabilisiert die negativ geladene anionische Form des Farbstoffes, wodurch die Farbe zu blau umschlägt. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm. Das Verhältnis von Proteinkonzentration und Absorptionsintensität bei 595 nm ist dabei annähernd proportional.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 980 µL Roti<sup>®</sup>-Quant-Reagenz (1x Konzentration) in Plastikkuvetten (Schichtdicke 1 cm) mit 20 µL Proteinprobe vermischt und 10 min bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm. Die Proteinkonzentrationen wurden durch den Vergleich mit BSA-Lösungen mit bekannter Konzentration bestimmt.

### 2.5.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das InuGB-V3-Rohenzym (Zellextrakt aus einer induzierten *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3-Kultur), der Zellextrakt einer nicht-induzierten *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3-Kultur (Kontrolle), sowie die

aufgereinigte Inulosucrase wurden einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, um die Proteinproduktion zu bewerten.

Durch die SDS-PAGE können Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Zellextrakt-Volumina, die 10 µg Gesamtprotein bzw. ein Elutionsfraktions-Volumen welches 1 µg aufgereinigter InuGB-V3 entsprach, wurden mit 4x Roti®-Load (Carl Roth Karlsruhe, Deutschland) zu einer 1x-Konzentration gemischt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die Proteine linearisiert. Außerdem lagerte sich das im 4x Roti®-Load-Puffer enthaltene SDS an die linearisierten Proteine an, wodurch die native Ladung des Proteins verdeckt und eine negative Ladung, welche proportional zur Größe des Proteins ist, eingebracht wurde. Nach der Vorbehandlung wurden die Proben sowie 10 µl des Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) auf ein vorgefertigtes 12 %iges Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel (10 Vertiefungen, 30 µl, Bio-Rad Laboratories, Inc.) geladen. Die Proteine wurden für 30 Minuten bei 250 V in 1x TGS-Puffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) getrennt. Durch das Anlegen der elektrischen Spannung durchwandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe die Gelmatrix. Kleinere Proteine durchwandern die Gelmatrix hierbei schneller, sodass die Größen der Proteine mit Hilfe des Protein-Standards abgeschätzt werden kann. Die verwendeten TGX Stain-Free™ Protein-Gele enthalten Trihalogen-Verbindungen, die mit Tryptophanresten von Proteinen in einer UV-induzierten Reaktion reagieren und Fluoreszenz erzeugen. Somit konnten die Proteine durch Fluoreszenzdetektion mit dem färbungsfreien ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) bei einer Aktivierungszeit von 45 s visualisiert werden.

## 2.6 Aktivitätsbestimmung von InuGB-V3 und InuGB-V3-Rohenzym

In dieser Arbeit wurde die Gesamtaktivität der aufgereinigten Inulosucrase sowie von InuGB-V3-Rohenzym bestimmt. Eine Einheit (U) der Inulosucrase-Aktivität ist definiert als die Freisetzung von 1 µmol Glucose pro Minute aus dem Substrat Saccharose. Die freigesetzte Glucose-Menge spiegelt die Menge an Saccharose wider, die in der Reaktion als Fructose-Donor verwendet wird, und repräsentiert somit sowohl die Transfructosylierungs- als auch die hydrolytische Aktivität (= Gesamtaktivität). Die freigesetzte Glucose in Enzymaktivitätstests wurde mit dem D-Glucose-Assay-Kit (GOPOD-Format; Megazyme, Bray, Irland) quantifiziert (Kapitel 2.8.1).

Die Enzymaktivitätstests wurden bei 40 °C in 1-mL-Assays mit 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) und 1 mM CaCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von InuGB-V3 bzw. InuGB-V3-Rohenzym zu den vorgewärmten Assay-Lösungen gestartet.

Innerhalb von 30 – 60 min wurden in regelmäßigen Abständen Proben im technischen Duplikat entnommen. Die Proben wurden 1:10 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  verdünnt und für 1,5 min auf 100 °C erhitzt, um die enzymatische Aktivität zu unterbrechen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelegt. Falls erforderlich, wurden die Proben vor der Durchführung der GOPOD-Tests entsprechend verdünnt.

### **2.6.1 Bestimmung der volumetrischen Aktivität von InuGB-V3-Rohenzym**

Um die volumetrische Aktivität der hergestellten InuGB-V3-Rohenzyme nach ihrer Präparation (Kapitel 2.5.1) und damit auch die Aktivitätsausbeute von InuGB-V3 aus 1 L *E. coli*-Kultur, zu bestimmen, wurden für jede InuGB-V3-Rohenzym-Lösung (im Triplikat vorliegend) drei Enzymaktivitätstests (s.o.) durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei verschiedene Mengen der Inulosucrase-reichen Rohextrakte in den Assays eingesetzt (0,5 – 2  $\mu\text{L}$ , Verdünnungen herausgerechnet). Die Enzymaktivitätstests wurden 30 min inkubiert.

### **2.6.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität von InuGB-V3**

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von InuGB-V3 wurden 4,5 bzw. 6,75  $\mu\text{g}$  aufgereinigte Inulosucrase in Enzymaktivitätstest (s.o.) eingesetzt. Die Assays wurden im Triplikat für 60 min durchgeführt.

### **2.6.3 Bestimmung der Temperaturstabilität des InuGB-V3-Rohenzym**

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des Enzyms wurden biologische Duplikate des InuGB-V3-Rohenzym in 1 mL 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) auf eine Endaktivität von 667  $\text{U mL}^{-1}$  verdünnt (anhand der zuvor bestimmten Volumenaktivität, Kapitel 2.6.1) und durch Filtration sterilisiert. 6  $\mu\text{L}$  Proben (4 U) wurden entnommen und in Enzymtests (s.o.) eingesetzt, um die Ausgangsaktivitäten zu bestimmen. Die rohen Enzymverdünnungen wurden 4 Tage lang bei 40 °C, 45 °C oder 50 °C inkubiert. Alle 24 Stunden wurden 6  $\mu\text{L}$  Proben entnommen und in Enzymaktivitätstests (s.o.) eingesetzt. Die verbleibenden Aktivitäten wurden dann mit der Ausgangsaktivität verglichen. Die Enzymaktivitätstests wurden 30 min inkubiert.

## **2.7 Enzymatische I-FOS-Synthese und Optimierung der I-FOS-Produktionsparameter**

Aufgereinigte InuGB-V3 bzw. InuGB-V3-Rohenzym wurde in verschiedenen Enzymtests zur Umsetzung von Saccharose zu I-FOS eingesetzt. Proben der Enzymreaktion wurden stets mit dem

vierfachen Volumen 96 % [v/v] Ethanol gemischt und kräftig gevortext, um die Reaktion zu stoppen und um polymeres Inulin auszufällen. Das Präzipitat wurde durch), um die Saccharose-Umsetzung und die I-FOS-Synthese zu bewerten.

### **2.7.1 Bestimmung der erforderlichen Menge an InuGB-V3-Rohenzym**

Die erforderliche Enzymmenge, um 90 % von 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose innerhalb von 24 h Inkubation bei 37 °C umzusetzen, wurde durch Zugabe abnehmender Mengen des InuGB-V3-Rohenzym zu einzelnen Enzymtests im Maßstab von 1 mL ermittelt. 1.500 - 54.000 U L<sup>-1</sup> InuGB-V3-Rohenzym wurden zu Saccharose-Lösungen (570 g L<sup>-1</sup>) hinzugefügt, die mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,6) versetzt und auf 37 °C vorgewärmt waren. Die Proben wurden unmittelbar nach Beginn der Reaktion und nach 24 Stunden Inkubation entnommen. Die Enzymtests wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt.

In nahezu identischer Vorgehensweise wurde die erforderliche Enzymmenge zur Umsetzung von 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose innerhalb von 24 h bestimmt. In diesen Enzymtests wurden (abweichend zu vorherigen Enzymtests mit 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose) 5.000 – 6.800 U L<sup>-1</sup> InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen aus 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) und 1 mM CaCl<sub>2</sub>, hinzugefügt. Die Enzymtests wurden ebenfalls im biologischen Triplikate, jedoch bei 40 °C durchgeführt.

Mittels HPLC wurden die Konzentrationen von Saccharose und Fructose in den Proben gemessen. Die freie Fructose stellte den Anteil der hydrolysierten Saccharose dar. Die Transfructosylierung wurde aus dem gesamten Saccharose-Umsatz abzüglich des hydrolysierten Saccharose-Anteils berechnet.

### **2.7.2 Enzymtests zur Optimierung der I-FOS-Produktionsparameter**

Um die optimalen Parameter für die Produktion von I-FOS zu ermitteln, wurden Enzymtests mit InuGB-V3-Rohenzym durchgeführt. In allen Enzymtests wurden 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose als Substrat verwendet. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4000 U L<sup>-1</sup> InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Reaktions-Lösungen gestartet. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Start der Reaktion und nach 24 h entnommen. Die Enzymtests erfolgten im biologischen Triplikate.

#### **2.7.2.1 Einfluss von Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und EDTA auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3-Rohenzym**

Um den Einfluss von Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) auf die Saccharose-Umwandlung und -Hydrolyse zu bestimmen, wurde den Enzymtests 1 mM CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>

oder EDTA- $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  zu den Enzymtests hinzugefügt, die mit 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,6) bei 37 °C durchgeführt wurden. Der Kontrolle wurde mit keinem Zusatz supplementiert.

#### **2.7.2.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3-Rohenzym**

Um den optimalen pH-Wert für Biokonversionsreaktionen mit InuGB-V3-Rohenzym zu ermitteln, wurden Enzymtests mit drei verschiedenen Puffern bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Niedrige pH-Werte von pH 2,5, 3,0 und 3,5 wurden mit 25 mM Citronensäure-Natriumphosphat-Puffer abgedeckt. 25 mM Natriumacetat-Puffer wurde verwendet, um den pH-Wert auf pH 3,5, 4,0, 4,5 und 5,5 einzustellen. Für pH 5,5, 6,0, 7,0 und 8,0 wurde 25 mM Kaliumphosphat-Puffer verwendet. Die pH-Werte, bei denen ein Pufferwechsel durchgeführt wurde (3,5 und 5,5), wurden jeweils mit beiden Puffersystemen untersucht, um einen eventuellen Einfluss der Puffersubstanzen sichtbar zu machen. Den Enzymtests wurden zudem 1 mM  $\text{CaCl}_2$  hinzugefügt. Sie wurden bei 37 °C inkubiert.

#### **2.7.2.3 Einfluss der Temperatur auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3-Rohenzym**

Die optimale Temperatur zur I-FOS-Synthese wurde bestimmt, indem Enzymtests bei 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 und 65 °C mit 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt wurden.

### **2.7.3 Enzymatische Synthese von I-FOS durch aufgereinigte InuGB-V3**

Die erste Produktion von I-FOS aus Saccharose wurde mit aufgereinigter Inulosucrase in einem Maßstab von 1,5 mL bei 37 °C im biologischen Triplikat durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µg aufgereinigter InuGB-V3 zu einer vorgewärmten Lösung aus 345 g  $\text{L}^{-1}$  Saccharose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,6) gestartet. Innerhalb von 4 h wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen.

### **2.7.4 Enzymatische Synthese von I-FOS durch InuGB-V3-Rohenzym aus 570 g $\text{L}^{-1}$ Saccharose**

Die Produktion von I-FOS aus 570 g  $\text{L}^{-1}$  Saccharose wurde in biologischen Triplikaten im 1-mL-Maßstab unter optimierten Bedingungen (Kapitel 3.4) durchgeführt. 4000 U  $\text{L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym wurden zu vorgewärmten Lösungen aus 570 g  $\text{L}^{-1}$  Saccharose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) gegeben. Die Assays wurden bei 40 °C inkubiert und innerhalb von 20 h regelmäßig beprobt.

### 2.7.5 Enzymatische Synthese von I-FOS durch InuGB-V3-Rohenzym aus 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose

Die I-FOS-Produktion aus 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose wurde in vier Replikaten und einem hochskalierten Volumen von 10 L für 20 h durchgeführt. Zum Starten der Biokonversion wurden 6000 U L<sup>-1</sup> InuGB-V3-Rohenzym zu Lösungen aus 800 g L<sup>-1</sup> Haushaltszucker (Saccharose), 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) gegeben, die auf 40 °C vorgewärmt waren. Aufgrund der erhöhten Substratkonzentration wurden die Proben zur Analyse der I-FOS-Synthese zunächst mit dem dreifachen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> verdünnt, um die Präzipitation von Saccharose zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben bearbeitet.

Zur Probennahme des polymeren Inulins aus dem hochskalierten Reaktionstest wurden 50-mL-Proben mit drei Volumina H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> verdünnt und dann gründlich mit vier Volumina Ethanol (96 % [v/v]) gemischt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (3.000 × g, 5 min) gesammelt, in 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> resuspendiert und nochmals wie zuvor ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 20 mL H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> gelöst, bei -70 °C eingefroren und 24 h lang gefriergetrocknet (Labor-Gefrieretrockner Alpha 1-4 LSCplus, Martin Christ Gefrieretrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland).

## 2.8 Enzymatische Nachweismethoden

### 2.8.1 Bestimmung von Glucose-Konzentrationen mittels des D-Glucose-Assay-Kits (GOPOD-Assay)

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität von InuGB-V3 und InuGB-V3-Rohenzym wurde die freigesetzte Glucose in Enzymaktivitätstests (Kapitel 2.6) mit dem D-Glucose-Assay-Kit (GOPOD-Format; Megazyme, Bray, Irland) quantifiziert. Diese Methode nutzt die Aktivität der Glucose-Oxidase und der Peroxidase. Die Glucose-Oxidase katalysiert zunächst die sauerstoff-abhängige Oxidation der Glucose zu Glucono- $\delta$ -lacton und Wasserstoffperoxid. Die Peroxidase vermittelt die Reduktion des Wasserstoffperoxids, einhergehend mit der Erzeugung eines Chinonimin-Farbstoffes aus *p*-Hydroxybenzoesäure und 4-Aminoantipyrin. Die Absorption des Chinonimin-Farbstoffes kann spektrophotometrisch bei 510 nm nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der freigesetzten Glucose mittels des GOPOD-Assays wurden je 6,66  $\mu$ L der Proben nach angemessener Verdünnung mit 200  $\mu$ L GOPOD-Reagenz vermischt und in 96-well-Platten gegeben. Nach 20 min Inkubation in Dunkelheit bei 42 °C wurde die Absorption bei 510 nm im Plattenlesegerät gemessen. Als Blank wurden 6,66  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> anstatt Probe verwendet. Zur Bestimmung der Glucose-Konzentrationen in den Proben diente die Absorption von Glucose-



Standards mit bekannter Konzentration. Für die Glucose-Standards wurden je 6,66  $\mu\text{L}$  Glucose-Lösungen mit Konzentrationen von 0,125 – 1  $\text{mg mL}^{-1}$  verwendet.

### 2.8.2 Enzymatische Hydrolyse von Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

Die in Wachstumsversuchen mit Darmbakterien eingesetzten Fructane (I-FOS, L-FOS, Inulin, Levan) wurden enzymatisch zu Fructose und Glucose hydrolysiert, um den Glucosegehalt der Substrate zu bestimmen. Außerdem wurde das präzipitierte Inulin aus der I-FOS-Produktionsreaktion basierend auf 570  $\text{g L}^{-1}$  Saccharose (Kapitel 2.7.4) mit Hilfe der enzymatischen Hydrolyse quantifiziert.

Die Fructane wurden zunächst im Reaktionspuffer (100 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,6 mit 1  $\text{mg mL}^{-1}$  BSA) bei 40 °C aufgelöst. Anschließend wurde die Hydrolyse-Reaktion durch die Zugabe von 9  $\mu\text{L}$  *Fructanase Mixture* (Ultrapure, rekombinant, flüssig, Megazyme Inc., Bray, Irland) pro 250  $\mu\text{L}$  Reaktionsvolumen gestartet. Das *Fructanase Mixture* enthält eine *endo*-Inulinase und eine *exo*-Inulinase aus *Aspergillus niger*, die die glycosidischen Bindungen in Inulin und Levan spalten, sodass Fructose und Glucose freigesetzt werden. Die Reaktion wurde nach 6 h Inkubation bei 40 °C gestoppt, indem die Proben mit dem vierfachen Volumen 80 % [v/v] Acetonitril gemischt wurden. Nach kräftigem Vortexen und Zentrifugieren bei 13.000  $\times g$  für 1 min wurden die Überstände chromatographisch analysiert.

## 2.9 Chromatographische Analyse von Zuckern und FOS

Die Proben der Inulosucrase-Assays, die Proben der Aktivkohle-Aufreinigung sowie die Substrate für die Wachstumsversuche wurden mittels isokratischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Die HPLC ist ein chromatographisches Verfahren, bei dem die im Laufmittel (mobilen Phase) gelösten Verbindungen (Analyte) anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften aufgetrennt werden. Die mobile Phase wird mit hohem Druck durch eine Trennsäule gepumpt, in der die stationäre Phase enthalten ist. Durch die Interaktion der Analyten mit der mobilen und stationären Phase verbleiben die Analyten abhängig von ihren Eigenschaften unterschiedlich lange in der Trennsäule (Retentionszeit). Die Retentionszeiten können wiederum mit Standards verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte Aminophasen-Trennsäulen als stationäre Phase verwendet. Diese basierten auf einer Kieselgel- (Europher II 100 NH<sub>2</sub>, s.u.) bzw. Polyvinylalkohol-Matrix (Shodex Ashiapak NH<sub>2</sub>P-50 4E, s.u.), die mit Aminopropyl-Gruppen modifiziert waren. Die endständigen Aminogruppen von Aminophasen-Trennsäulen verleihen der stationären Phase einen polaren

Charakter und ermöglichen hydrophile sowie ionische Interaktionen mit den Analyten, sodass die Analyten anhand ihrer steigenden Polarität eluieren. Somit entsprach das verwendete HPLC-Verfahren der Hydrophilen-Interaktionschromatographie (HILIC).

### 2.9.1 Probenvorbereitung

Proben, welche Inulin oder Levan enthielten wurden mit dem vierfachen Volumen 96 % [v/v] Ethanol versetzt, kräftig gevortext und bei  $13.000 \times g$  für 1 min zentrifugiert. Durch dieses Vorgehen wurden die polymeren Fructane präzipitiert und pelletiert.

Alle Proben wurden vor der HPLC-Messung so mit einer  $H_2O_{\text{demin}}$ -Acetonitril-Lösung verdünnt, dass die endgültige Acetonitril-Konzentration der des Laufmittels entsprach. Schlussendlich wurde ein Zentrifugations-Schritt ( $13.000 \times g$  für 1 min) durchgeführt, um Partikel zu entfernen.

### 2.9.2 Verwendete Instrumentation und Messbedingungen

Für alle Messungen wurde das HPLC-System SpectraSYSTEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet, das mit einem Entgaser (SpectraSYSTEM SCM1000), einer Pumpe (SpectraSYSTEM P4000), einem Autosampler (SpectraSYSTEM AS3000) und einem Brechungsindexdetektor (RI) (Shodex RI-101; Showa Denko Europe GmbH, München, Deutschland) ausgestattet war. Die Bedienung der HPLC-Anlage und die Datenauswertung erfolgte mit ChromQuest 5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Die Probentrennung erfolgte zunächst mit der Aminophasensäule Eurospher II 100 NH2 (250 x 3,0 mm; 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße; Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) mit integrierter Vorsäule bei 40 °C. Die Messungen erfolgten mit einer Durchflussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  und einer Lösungsmittel-Konzentration von 60 % [v/v] Acetonitril. Die späteren Messungen wurden mit der Aminophasensäule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E (4,6 x 250 mm; 100 Å Porengröße; 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße; Showa Denko Europe GmbH, München, Deutschland) und der Vorsäule NH2P-50G 4A (4,6 x 10 mm; 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße; Showa Denko Europe GmbH) durchgeführt, da diese Säule eine höhere Stabilität aufwies (Begründung s. Kapitel 3.2.4). In Kombination mit der HPLC-Säule Shodex Ashiapak wurde für die Analyse von Fructose, Glucose und Saccharose 65 % [v/v] Acetonitril als Lösungsmittel bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  bei 40 °C verwendet. Für die Trennung von Fructose, Glucose, Saccharose und FOS wurden eine Durchflussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  und eine Lösungsmittel-Konzentration von 58 % [v/v] Acetonitril verwendet.

Die Saccharide in den Proben wurden durch den Vergleich der Retentionszeiten der Saccharide, mit denen von kommerziellen Standards identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte nach der externen

Standardmethode unter Verwendung der Standardsubstanzen Fructose, Glucose, Saccharose, 1-Kestotriose, 1,1-Kestotetraose, 1,1,1-Kestopentaose, Levanbiose und Levantriose. Die Quantifizierung aller I-FOS, einschließlich I-FOS mit einem DP > 5, erfolgte unter Ausnutzung der linearen Beziehung zwischen Peakfläche und DP (Kapitel 3.2.2)

### 2.9.3 Validierung der HPLC-Methode

Die isokratische HPLC-Methode zur Analyse der mit InuGB-V3 synthetisierten I-FOS mit Hilfe der HPLC-Säule Eurospher II 100 NH2 (s.o.), wurde validiert. Die Trennung der Substanzen wurde anhand ihrer Auflösung ( $R_s$ ) bewertet, die nach der Formel des Amerikanischen Arzneibuches (United States Pharmacopeia, USP)  $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/w_{b1} + w_{b2}$  berechnet wurde, wobei  $t_{R2}$  = Retentionszeit des Peaks von Interesse,  $t_{R1}$  = Retentionszeit des vorhergehenden Peaks,  $w_{b2}$  = Peak-Breite an der Basis des Peaks von Interesse und  $w_{b1}$  = Peak-Breite an der Basis des vorhergehenden Peaks.

Die Präzision der Methode wurde durch das wiederholte Messen einer InuGB-V3-Probe und der darauf beruhenden Berechnung der relativen Standardabweichung (RSD, %) der Retentionszeit- und Peakflächen-Werte bewertet. Da hoch-reine I-FOS mit einem DP > 5 nicht im Handel erhältlich sind, wurde in den Messungen zur Präzision eine Probe eines InuGB-V3-Assays verwendet. Die Wiederholbarkeit wurde durch drei Injektionen derselben Probe innerhalb eines Tages (*Intraday*-Präzision) ermittelt. Die interne Laborpräzision wurde durch Messung derselben Probe an drei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht (*Interday*-Präzision). Die RSD-Werte wurden wie folgt berechnet:  $RSD [\%] = 100(sd/x_{mean})$ , wobei  $sd$  = Standardabweichung und  $x_{mean}$  = Mittelwert der Messergebnisse.

## 2.10 Aufreinigung von I-FOS mit Aktivkohle

Der I-FOS-reiche Sirup aus der Produktion im 10-Liter-Maßstab wurde mit Hilfe von Aktivkohle aufgereinigt. Aktivkohle hat aufgrund ihrer großen Oberfläche und ihres Porenvolumens eine gute Sorptionskapazität und kann zur schnellen, einfachen und kostengünstigen Aufreinigung von Kohlenhydraten mittels Adsorptionschromatographie eingesetzt werden. Die Aktivkohle wird bei der Adsorptionschromatographie als stationäre Phase verwendet und interagiert mit zugegebenen Soluten über van-der-Waals-Kräfte sowie hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen (Campos et al. 2017). Je hydrophober ein Adsorbens ist, umso stärker wird es an die Aktivkohle gebunden. Mit Wasser und Ethanol-Lösungen können zurückgehaltene Stoffe von der Aktivkohle

eluiert werden. Die Adsorptionsaffinität von Zuckern nimmt mit ihrem Molekulargewicht zu, sodass Mono- und Disaccharide im Gegensatz zu Oligosacchariden eine schwächere Affinität für die Aktivkohle aufweisen und mit Wasser und niedrig-konzentrierten Ethanol-Lösungen effizient von der Aktivkohle eluiert werden können, während zur Elution von Oligosacchariden höhere Ethanol-Konzentrationen benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivkohle DARCO® (-100 mesh Partikelgröße; Pulver; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> und Reinst-Ethanol (2-100 % [v/v]) dienen als Elutionsmittel und wurden vor der Elution auf die gewünschte Elutions-Temperatur erwärmt (40 – 60 °C). Die Inkubationsschritte wurden bei 250 rpm in einem temperaturgesteuerten Schüttelinkubator (Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Alle Experimente erfolgten in Triplikaten.

### 2.10.1 Protokoll-Entwicklung im 1-mL-Maßstab

Zunächst wurde ein Protokoll im 1-mL-Maßstab erstellt. Um ein geeignetes Verhältnis von Gesamtzuckermenge zu Aktivkohle zu ermitteln, wurden 100 mg Aktivkohle mit 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> und 21 - 250 µL I-FOS-reichem Sirup gemischt, was einem Saccharid:Aktivkohle-Verhältnis von 1:6 - 1:0,5 [g/g] entsprach. Nach 45-minütiger Inkubation bei 40 °C wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (5.000 × g, 1 min) vom Überstand getrennt. Um die adsorbierten Zucker zu eluieren, wurden mehrere aufeinander folgende Elutionsschritte durchgeführt. Bei jedem Elutionsschritt wurde die Aktivkohle mit 1 mL Lösungsmittel gemischt, 15 Minuten bei 40 °C inkubiert (sofern nicht anders angegeben) und durch Zentrifugation (5.000 × g, 1 min) für den nächsten Elutionsschritt von der Elutionsfraktion getrennt. Im endgültigen Elutions-Protokoll wurden die ersten fünf Elutionsschritte (E) jeweils 15 Minuten lang mit E1 = 0 %, E2 = 0 %, E3 = 0 %, E4 = 2,5 %, E5 = 3,5 % Ethanol [v/v] durchgeführt. Anschließend wurden 20 Minuten lang Elutionsschritte mit E6 = 30 %, E7 = 50 %, E8 = 80 % Ethanol [v/v] durchgeführt.

Alle Elutionsfraktionen wurden einer HPLC-Analyse unterzogen, um die Konzentrationen von Zuckern und I-FOS zu bestimmen. Die Verdünnungen des I-FOS-reichen Sirups, die bei der Aufreinigung verwendet wurden, wurden ebenfalls gemessen, um die Konzentrationen der Ausgangssubstanzen zu ermitteln.

Die Reinheit und die Rückgewinnung der I-FOS in den Elutionsfraktionen wurde wie folgt berechnet: Rückgewinnung [% w/w] =  $m_{\text{eluiert}} / m_{\text{aufgetragen}} \times 100$  ( $m_{\text{eluiert}}$  = die eluierte Menge an I-FOS [mg] und  $m_{\text{aufgetragen}}$  = die applizierte Menge [mg]). Reinheit [% w/w] =  $m_{\text{I-FOS}} / m_{\text{Saccharide}} \times 100$  ( $m_{\text{I-FOS}}$  = eluierte Menge an I-FOS [mg] und  $m_{\text{Saccharide}}$  = eluierte Menge an allen Sacchariden [mg]).

### 2.10.2 Upscaling auf einen 1-L-Maßstab

Das endgültige Elutions-Protokoll (Kapitel 2.10.1) wurde auf einen Maßstab von einem Liter hochskaliert, wobei 100 g Aktivkohle, 21 mL I-FOS-reicher Sirup und je 1 L Lösungsmittel in einem 2-L-Erlenmeyerkolben verwendet wurden. Zwischen den einzelnen Elutionsschritten wurde die Aktivkohle durch Vakuumfiltration von der Elutionsfraktion getrennt. Hierfür wurden mit Zellulose-Filterpapieren (Rundfilter ROTILABO® Typ 13A Carl Roth Karlsruhe, Deutschland) ausgekleidete 1-L-Büchner-Trichtern in Kombination mit einer Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland) verwendet. Für jeden Filtrations-Schritt wurde ein neues Filterpapier verwendet.

### 2.10.3 Aufbereitung der I-FOS

Die Elutionsfraktionen aus dem Aufreinigungs-Prozess im 1-L-Maßstab mit dem höchsten I-FOS-Gehalt (E6 – E8 = 30 - 80 % EtOH) wurden zusammengeführt. Anschließend wurden das Ethanol und der größte Teil des Wassers mit einem Rotationsverdampfer (IKA RV 05-ST, Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland) entfernt, sodass 95 % der Flüssigkeit eliminiert wurden. Zu diesem Zweck wurde ein abnehmender Druck von 60 - 130 mbar (Vakuumsystem B-172, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) und ein Wasserbad (80 °C) verwendet. Die verbleibende I-FOS-Lösung wurde bei -70 °C eingefroren und 24 h lang lyophilisiert (Labor-Gefriertrockner Alpha 1-4 LSCplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Anschließend wurden die I-FOS in einem Mörser zu einem Pulver vermahlen.

## 3 Ergebnisse

I-FOS sind präbiotische Kohlenhydrate, die primär aus Fructose-Einheiten bestehen, welche über  $\beta$ -(2,1)-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. I-FOS können mittels Inulosucrase-Enzymen aus dem Substrat Saccharose produziert werden. Die Inulosucrasen katalysieren die Spaltung der glykosidischen Bindung der Saccharose und den Transfer der Fructose-Einheit auf Saccharose und bereits gebildete I-FOS (Transfructosylierungs-Reaktion). I-FOS die enzymatisch aus Saccharose synthetisiert wurden verfügen deshalb über einen terminalen  $\alpha$ -(1,2)-verknüpften Glucose-Rest.

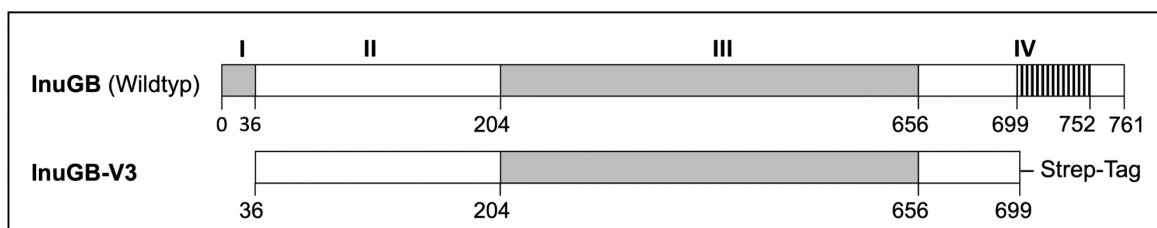
In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass der regelmäßige Verzehr dieser kalorienarmen Ballaststoffe die Zusammensetzung und Aktivität der Darmmikrobiota positiv beeinflusst (Mutanda et al. 2014). Aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung sowie einiger nützlicher funktioneller Eigenschaften (Schaafsma und Slavin 2015; Shoaib et al. 2016) wächst der Weltmarkt für I-FOS ständig und wird voraussichtlich weiter expandieren (Choukade und Kango 2021). Die hohen Kosten von I-FOS sind jedoch nach wie vor ein Hindernis für ihre breitere Anwendung. Aus diesem Grund besteht ein anhaltender Bedarf an neuen, effizienten biotechnologischen Ansätzen für die I-FOS-Produktion (Choukade und Kango 2021; Nobre et al. 2022).

### 3.1 Produktion der Inulosucrase InuGB-V3

#### 3.1.1 Die Inulosucrase InuGB-V3

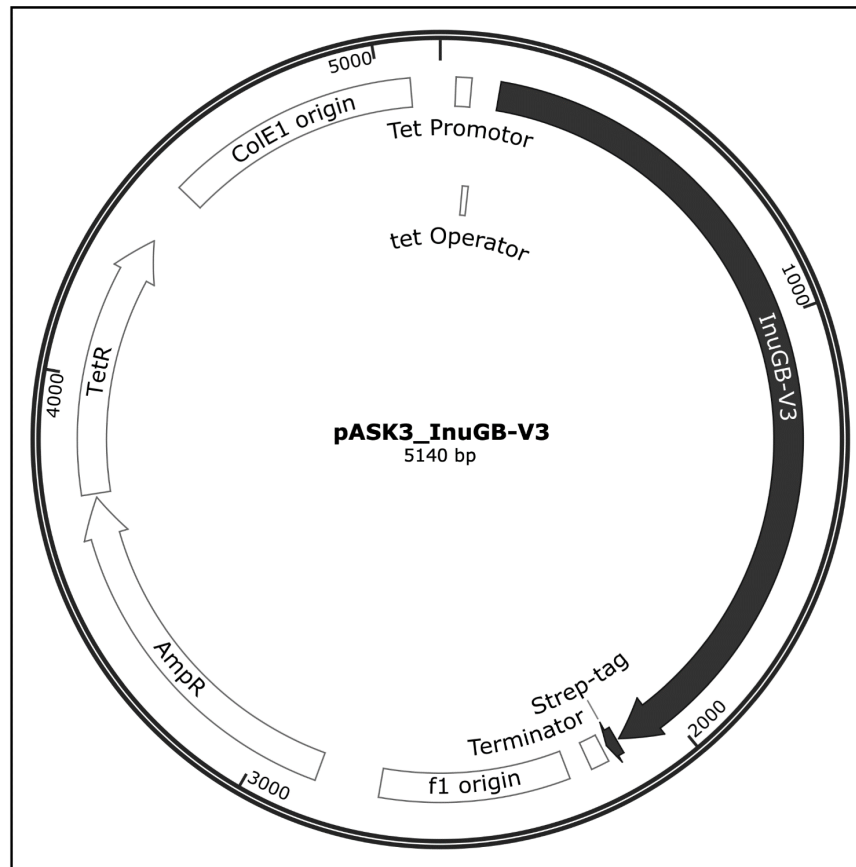
In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 zur effizienten Produktion von I-FOS genutzt werden kann. Verschiedene verkürzte Versionen der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 (InuGB) wurden bereits auf ihre Fähigkeit zur Synthese von Inulin und I-FOS untersucht. Die von Anwar und Kollegen (2010) untersuchte katalytische Aktivität von InuGB-R führte vor allem zur Akkumulation von I-FOS, die von DP2 bis DP13 reichten. Unter Verwendung einer alternativen Trunkierung konnten Ni et al. (2018) die Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 zur Herstellung von polymerem Inulin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von  $5,858 \times 10^6$  Da verwenden. Im Gegensatz dazu verwendeten Díez-Municio et al. das Enzym für die Herstellung von I-FOS und alternativen Oligofructosiden (Díez-Municio et al. 2016; Díez-Municio et al. 2015; Díez-Municio et al. 2013).

In Experimenten, die dieser Arbeit vorhergingen, wurde eine neue, verkürzte Variante der Inulosucrase namens InuGB-V3 erstellt (Wienberg 2019). Die Aminosäure-Sequenz der Inulosucrase wurde so verkürzt, dass die Motive zur Zellwandverankerung (einschließlich der PXX-Wiederholungen), die in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind (AS 700 – 752) sowie die Signalsequenz, die sich am N-terminalen Ende des Proteins befindet, entfernt wurden. Dieses Vorgehen lag darin begründet, dass die Klonierung und Produktion der Inulosucrase aus *L. reuteri* in voller Länge in *E. coli* zu Klonierungs- und Expressionsproblemen führte, die durch die Entfernung der am C-Terminus befindlichen Zellwandverankerungsmotive behoben werden konnten (van Hijum et al. 2002). Die Deletion dieser C-terminalen Motive sowie eines Teils des N-Terminus, der ein Signalpeptid enthält, wurde auch in mehreren anderen Veröffentlichungen beschrieben, um die heterologe Überproduktion von Inulosucrasen zu ermöglichen (Ni et al. 2019). Daher wurde die Inulosucrase InuGB in dieser Arbeit so gekürzt, dass das Protein vor den PXX-Wiederholungen am C-Terminus endete (AS 700 - 752). Die Signalsequenz am N-Terminus wurde ebenfalls eliminiert. Somit blieb die N-terminale variable Region intakt, was das konstruierte Protein von bereits beschriebenen Versionen der gleichen Inulosucrase unterscheidet. Bei diesen ist der N-terminale variable Bereich deutlich verkürzt und Reste der PXX-Wiederholungen bleiben am C-Terminus erhalten (Anwar et al. 2010; Díez-Municio et al. 2013; Ni et al. 2018, Abb. 4).



**Abbildung 4. Struktur des Wildtyp-Proteins (InuGB) und der rekombinanten Variante (InuGB-V3) der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604.** InuGB-V3: In dieser Arbeit zur I-FOS-Produktion eingesetzte Variante, AS 37-699 (Wienberg et al. 2019). I: Signalpeptid, II: N-terminale variable Region, III: katalytische Domäne, IV: C-terminale Domäne mit PXX-Wiederholungen des Zellwandverankerungsmotivs (schwarz schraffierter Kasten).

Zur Konstruktion des Überexpressions-Plasmids wurde die 5'- und 3'-verkürzte Sequenz des Inulosucrase-Gens *inuGB* (GenBank: ACZ6728.1, NT 109–2097/AS 37–699) mittels PCR aus *L. gasseri* DSM 20604-Zellen amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mittels Restriktions-Ligations-Klonierung in-frame mit dem C-terminalen Strep-Tag II in den pASK-IBA3-Vektor eingebracht (Wienberg et al. 2021). Dieser Vorgang resultierte in dem Plasmid pASK3\_InuGB-V3, welches durch Hitzeschock in *E. coli* transformiert wurde (Abb.5).



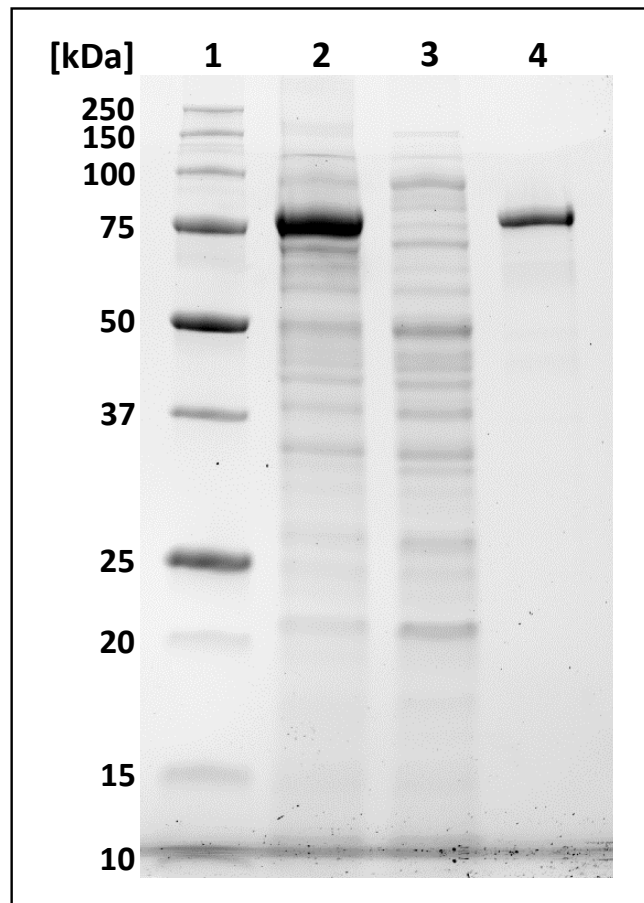
**Abbildung 5. Karte des Überexpressions-Plasmids pASK3\_InuGB-V3.** Das Plasmid ist ein Derivat von pASK-IBA3. InuGB-V3: Sequenzabschnitt von Nukleotid 109-2097 des Inulosucrase-Gens *inuGB* aus *L. gasseri* DSM 20604 (GenBank: ACZ6728.1). Weitere Informationen s. Kapitel 2.2.2, Tabelle 5.

### 3.1.2 Produktion, Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung von InuGB-V3

Die Inulosucrase wurde heterolog in *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 (Abb. 5) unter Verwendung von TB-Medium produziert, was zu einer finalen optischen Dichte (OD 600 nm) von  $3,4 \pm 1,4$  und einer Feucht-Biomasse von  $8,1 \pm 1,3 \text{ g L}^{-1}$  nach 21 Stunden Inkubation führte. Nach der Zellernte und -Lyse wurde durch das Mischen von gereinigtem Zelllysat mit demselben Volumen Glycerin InuGB-V3-Rohenzym gewonnen. Um den Anteil des heterologen Enzyms an der gesamten Proteinzusammensetzung des erzeugten rohen Zellextrakts zu bestimmen, wurde eine SDS-PAGE mit Proben aus der InuGB-V3-Produktion durchgeführt (Abb. 6). In dem aus *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 gewonnenen Zellrohextrakt wurde eine starke Bande mit einer Masse von 75 kDa beobachtet (Abb. 6). Diese Bande entsprach der erwarteten Größe von InuGB-V3 (74 kDa) und machte den Hauptanteil der gesamten Proteinzusammensetzung aus. Im Gegensatz dazu war die 75-kDa-Bande im Extrakt einer nicht-induzierten Kultur sehr schwach. Aus den InuGB-V3-Rohenzym-Präparaten konnten mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie  $139 \pm 19 \text{ mg}$  InuGB-V3 pro L *E. coli* Kultur aufgereinigt werden (Abb. 6). Da bei einer chromatographischen



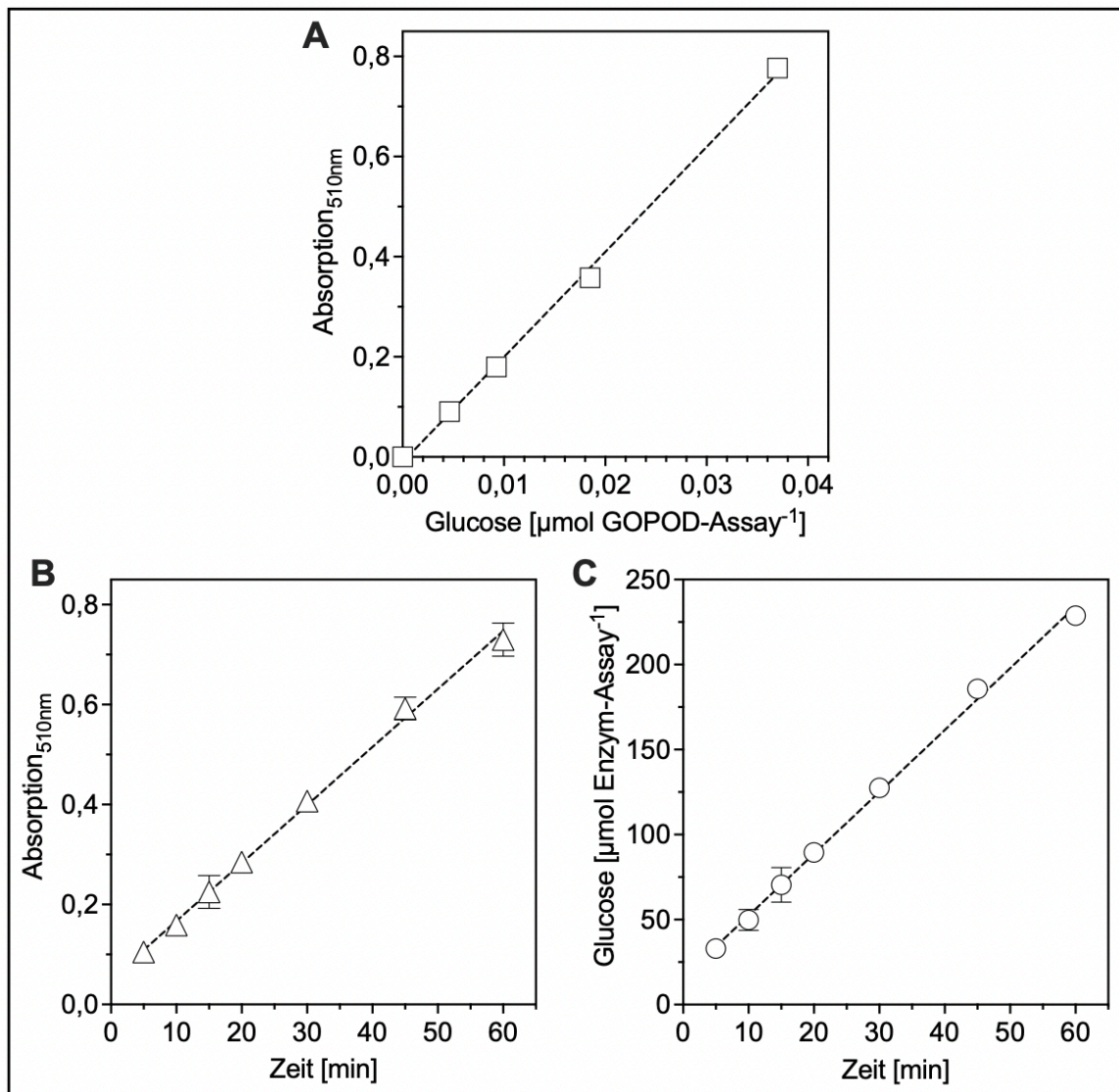
Aufreinigung stets ein Teil des Proteins verloren geht, war allerdings anzunehmen, dass die tatsächliche Protein-Menge größer war (s. u.).



**Abbildung 6. SDS-PAGE von Zellextrakten aus einer InuGB-V3 produzierenden Kultur und des gereinigten Enzyms.** 1: Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad), 2: roher Zellextrakt, hergestellt aus einer induzierten Kultur von *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3 (InuGB-V3-Rohenzym), 3: roher Zellextrakt, hergestellt aus einer nicht-induzierten Kultur von *E. coli* BL21 pASK3\_InuGB-V3, 4: aufgereinigte InuGB-V3. Zellextraktvolumina die 10 µg Gesamtprotein entsprachen, wurden auf ein vorgefertigtes Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel 12 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) geladen, während 1 µg des aufgereinigten Enzyms für die Analyse verwendet wurde. Die Proteine wurden durch Fluoreszenzdetektion mit dem ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) sichtbar gemacht.

Sowohl das aufgereinigte Enzym als auch das InuGB-V3-Rohenzym wurde in Enzym-Assays eingesetzt, um die spezifische Aktivität von InuGB-V3 bzw. die Volumenaktivität des Rohenzymes zu bestimmen. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte die Aktivitäts-Bestimmung im Triplikate, zur Analyse der Volumenaktivität des InuGB-V3-Rohenzymes wurden für jedes Rohenzym-Präparat drei Enzym-Assays mit unterschiedlichen Mengen Inulosucrase-reichem Rohextrakt durchgeführt. Innerhalb von 60 min wurden den Enzym-Assays regelmäßig Proben

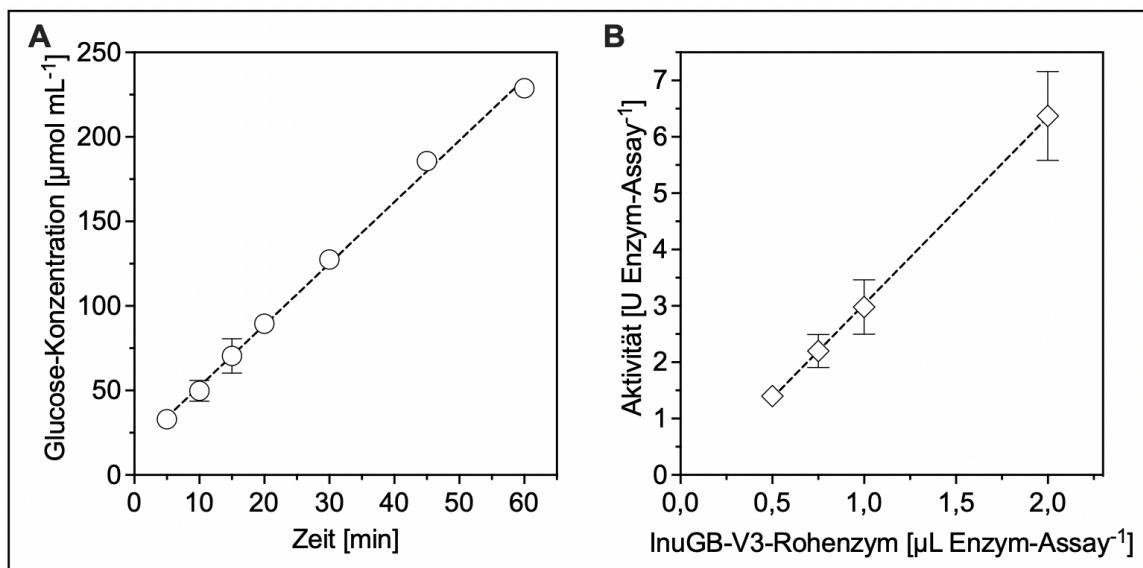
entnommen. Die während der Enzymreaktionen aus Saccharose freigesetzten Glucose-Mengen (die sowohl die Transfructosylierung als auch die hydrolytische Aktivität widerspiegeln) wurden anschließend bestimmt, indem die Enzym-Assay-Proben in GOPOD-Assays (Megazyme Inc.) eingesetzt wurden (Abb. 7, 8).



**Abbildung 7. Bestimmung der spezifischen Aktivität von InuGB-V3 mittels GOPOD-Assays. (A)** Beispiel-Darstellung der Absorption des Glucose-Standards nach GOPOD-Reaktion. **(B)** Zunahme der Absorption in einem Enzym-Assay. **(C)** Zunahme der Glucose-Konzentration in einem Enzym-Assay. **(B, C)** Darstellung der Mittelwerte der technischen Duplikate der Probennahme mit Standardabweichung. Die Enzym-Assays wurden durch Zugabe von 4,5 bzw. 6,75  $\mu\text{g}$  aufgereinigter InuGB-V3 zu vorgewärmten Lösungen aus 800  $\text{g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  gestartet. Aus den Reaktionsansätzen, die bei 40 °C durchgeführt wurden, wurden innerhalb von 60 min mehrere Proben im technischen Duplikat entnommen (Details s. Kapitel 2.6). Die Enzymreaktionen wurden im 1-mL-Maßstab im Triplikat ausgeführt. Die in den Proben enthaltenen Glucose-Konzentrationen wurden entsprechend den Hersteller-Angaben mit dem D-Glucose-Assay-Kit, GOPOD-Format (Megazyme Inc.) in 96-well-Platten bestimmt (Details s. Kapitel 2.8.1). Zur Quantifizierung der Glucose in den GOPOD-Assays diente die Absorption von Glucose-Standards mit bekannter Konzentration (A).

Diese Methode nutzt die Aktivität einer Glucose-Oxidase und einer Peroxidase, um einen Chinonimin-Farbstoff zu erzeugen, dessen Absorption spektrophotometrisch bei 510 nm nachgewiesen werden kann. Die Absorption steigt proportional mit Zunahme der Glucose-Konzentration.

Aufgrund der Inulosucrase-Aktivität wurde in allen Enzym-Assays mit fortschreitendem Verlauf der Enzym-Reaktionen ein linearer Anstieg der Absorption nachgewiesen (beispielhaft dargestellt in Abb. 7B). Mit Hilfe der Absorption von Glucose-Standards mit bekannter Konzentration (beispielhaft dargestellt in Abb. 7A) konnten die in den Enzym-Assays steigenden Glucose-Mengen ( $\mu\text{mol}$ ) quantifiziert werden (beispielhaft dargestellt in Abb. 7C, 8A). Durch den Bezug auf die Inkubationszeit und die eingesetzte Enzym-Menge wurde der aufgereinigten Inulosucrase eine spezifische Aktivität von  $545 \pm 17 \text{ U mg}^{-1}$  nachgewiesen (Abb. 7C).



**Abbildung 8. Bestimmung der Volumenaktivität des InuGB-V3-Rohenzym mittels GOPOD-Assays.** Zur Bestimmung der Volumenaktivität jedes Replikats des InuGB-V3-Rohenzym wurden je drei Enzymassays im 1-mL-Maßstab mit unterschiedlichen Mengen (0,5 - 2  $\mu\text{L}$ , Verdünnungen herausgerechnet) an Inulosucrase-reichem Rohextrakt durchgeführt. **(A)** Zunahme der Glucose-Konzentration in einem Enzym-Assay, dargestellt ist der Mittelwert des technischen Duplikats der Probenahme mit Standardabweichung. **(B)** Auftragung der in den Enzym-Assays ermittelten Enzym-Aktivitäten (A) gegen die verwendeten Rohenzym-Mengen.  $\text{U} = \mu\text{mol Glucose min}^{-1}$ . Die Enzym-Assays wurden durch Zugabe von InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen aus  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  gestartet. Aus den Reaktionen, die bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt wurden, wurden innerhalb von 30 min mehrere Proben im technischen Duplikat entnommen (Details s. Kapitel 2.6). Die in den Proben enthaltenen Glucose-Konzentrationen wurden entsprechend den Hersteller-Angaben mit dem D-Glucose-Assay-Kit, GOPOD-Format (Megazyme Inc.) in 96-well-Platten bestimmt (Details s. Kapitel 2.8.1). Zur Quantifizierung der Glucose in den GOPOD-Assays diente die Absorption von Glucose-Standards mit bekannter Konzentration (s. Abb 7A).

Zur Bestimmung der Volumenaktivität des InuGB-V3-Rohenzym wurden die ermittelten, in den einzelnen Enzym-Assays freigesetzten Glucose-Mengen ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ) mit der jeweilig eingesetzten Menge an Rohenzym-Lösung korreliert (Abb. 8B). Aus dem linearen Anstieg der Enzymaktivität mit steigender Menge an Rohenzym-Lösung wurde ersichtlich, dass die Volumenaktivität der Rohenzym-Lösungen  $3.000 \pm 290 \text{ U mL}^{-1}$  betrug (Abb. 8).

Anhand der bestimmten Volumenaktivität sowie dem Volumen der aus den Produktionskulturen gewonnenen Rohenzym-Lösungen (ca. 40 mL), konnte für InuGB-V3 eine volumetrische Aktivitätsausbeute von  $120.000 \pm 11.000 \text{ U pro L Produktionskultur}$  erzielt werden. Wurde die spezifische Aktivität von InuGB-V3 und dessen volumetrische Aktivitätsausbeute zusammengenommen, ergab dies eine theoretische Proteinausbeute von ca. 220 mg InuGB-V3 pro L Produktionskultur. Daraus ist zu schließen, dass InuGB-V3 etwa einen Anteil von 25 % am Gesamtprotein ( $883 \pm 121 \text{ mg L}^{-1}$ ) ausmachte.

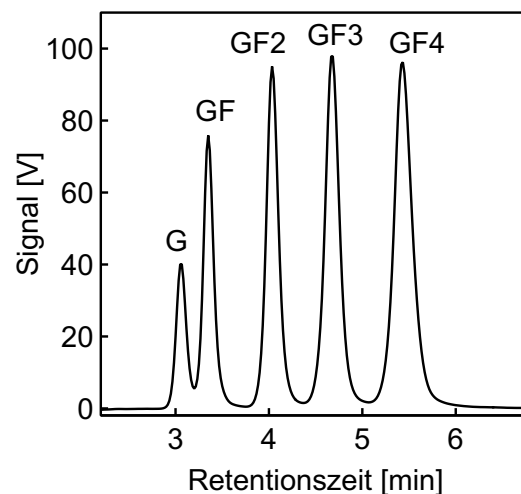
## **3.2 Entwicklung einer hochauflösenden Methode für die isokratische HPLC-Analyse von I-FOS**

### **3.2.1 Chromatographische Analyse von kommerziell erhältlichen I-FOS**

Um die Inulosucrase InuGB-V3 umfangreich charakterisieren und ihre Leistung hinsichtlich der I-FOS-Synthese bewerten zu können, musste zunächst eine geeignete Methode zur Detektion und Quantifizierung von I-FOS entwickelt werden. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) sind gängige, gut geeignete chromatographischen Methoden für die qualitative und quantitative Analyse von Kohlenhydraten (Sangeetha et al. 2005). Zumeist werden die HPLC- und HPAEC-Methoden in Verbindung mit Gradienten-Elution angewendet. Diese Verfahren werden aufgrund der hohen Anforderungen an die Instrumentation jedoch teure Geräte benötigt. Bestehende isokratische HPLC-Methoden hatten hingegen den Nachteil, dass mittel- und langkettige I-FOS nicht ausreichend analysiert werden können. Deshalb sollte eine isokratische HPLC-Methode etabliert werden, die zur Analyse von bakteriellen I-FOS, die kurz-, mittel- und langkettige I-FOS umfassen, geeignet ist. Hierbei wurde auf die Dissertation von Marcel Hövels aufgebaut, in der sich die Aminophasensäule Eurospher II 100 NH2 (Knauer GmbH) im HILIC-Modus als geeignet für die Analyse von kurzkettigen, kommerziell erhältlichen I-FOS sowie von bakteriell synthetisierten, kurzkettigen L-FOS herausstellte (Hövels 2020). Hierfür wurden die Analyse-Eigenschaften der genannten Aminophasensäule in Kombination mit 58-70 %

[v/v] Acetonitril bezüglich bakterieller I-FOS im Detail untersucht und evaluiert. Die Zucker wurden mit einem Brechungsindex-Detektor (RI) quantifiziert.

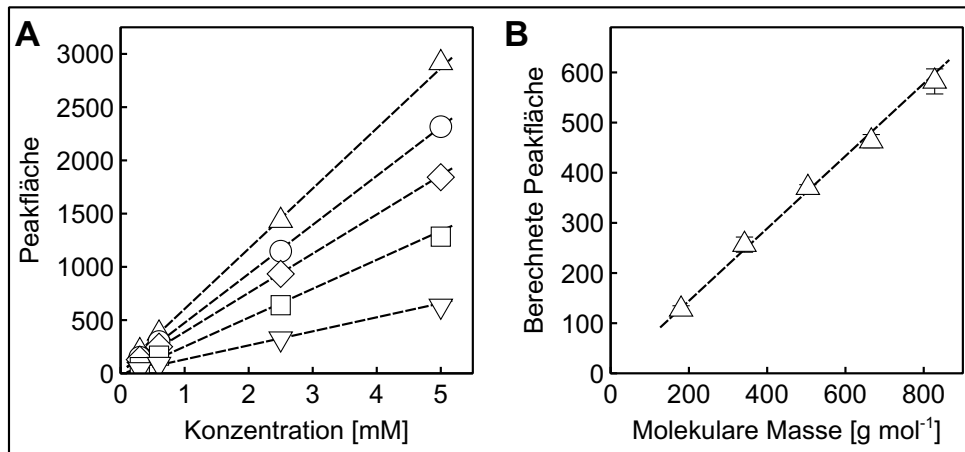
Zunächst wurde eine Standardmischung der im Handel erhältlichen I-FOS 1-Kestotriose, 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose sowie Glucose und Saccharose gemessen. Bei Verwendung von 60 % Acetonitril als Lösungsmittel wurde innerhalb von 6 Minuten eine Basislinientrennung von Saccharose, 1-Kestotriose, 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose erreicht (Abb. 9). Während niedrigere Acetonitril-Konzentrationen für die Trennung kleiner Zuckermoleküle ungeeignet waren, führten höhere Acetonitril-Konzentrationen erwartungsgemäß zu einer besseren Auflösung von Glucose und Saccharose (Wienberg et al. 2021). Da höhere Acetonitril-Anteile jedoch auch die Messzeit drastisch erhöhten, wurden höhere Acetonitril-Konzentrationen für ein effizienteres Zeit- und Ressourcenmanagement nicht berücksichtigt.



**Abbildung 9. Beispiel-Chromatogramm einer I-FOS-Standardmischung.** Die verwendete Mischung enthielt die Standardsubstanzen Glucose (G), Saccharose (GF), 1-Kestotriose (GF2), 1,1-Kestotetraose (GF3) und 1,1,1-Kestopentaose (GF4) in je 2,5 mM-Konzentration. Die HPLC-Messung wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei  $40^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

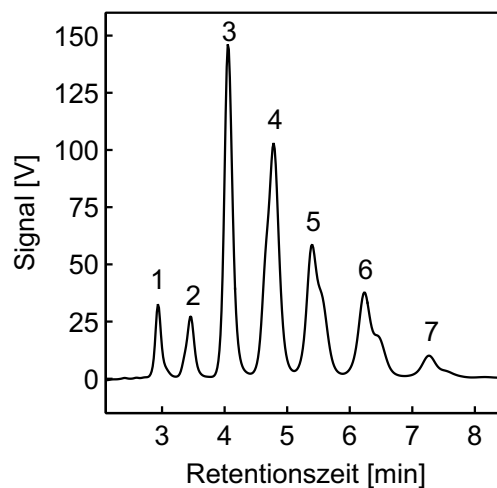
Die Messung der Standardsubstanzen ergab eine lineare Korrelation zwischen dem Anstieg des DP und der Peakfläche (Abb. 10). Dies eröffnete die Möglichkeit, eine Kalibrierkurve für die Quantifizierung von I-FOS mit einem höheren DP als 1,1,1-Kestopentaose zu erstellen. Zu diesem Zweck wurden die Peakflächen jeder Substanz (in Standardmischungen von je vier Konzentrationen) mit ihrer entsprechenden Konzentration korreliert (Abb. 10A). Durch das Auftragen der auf diese Weise berechneten theoretischen Peakflächen bei 1 mM

Standardkonzentration gegen die Molekulare Masse der Substanzen wurde eine Kalibrierkurve mit einer Linearität von  $R^2 = 0,9994$  erstellt (Abb. 10B).



**Abbildung 10. Erstellung einer Kalibrierkurve für I-FOS. (A)** Peakflächen der Standardsubstanzen Glucose (▽), Saccharose (□), 1-Kestotriose (◇), 1,1-Kestotetraose (○) und 1,1,1-Kestopentaose (△) bei vier Konzentrationen (0,3, 0,6, 2,5 und 5 mM). **(B)** Kalibrierkurve, die die Korrelation zwischen Peakfläche (basierend auf der linearen Regressionsanpassung in (B)) und DP zeigt. HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei  $40 \text{ °C}$  durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

Die Analyse von aus Chicorée stammenden I-FOS zeigte, dass die verschiedenen Polymerisationsstufen wie erwartet bis zu DP7 getrennt werden konnten (Abb. 11).



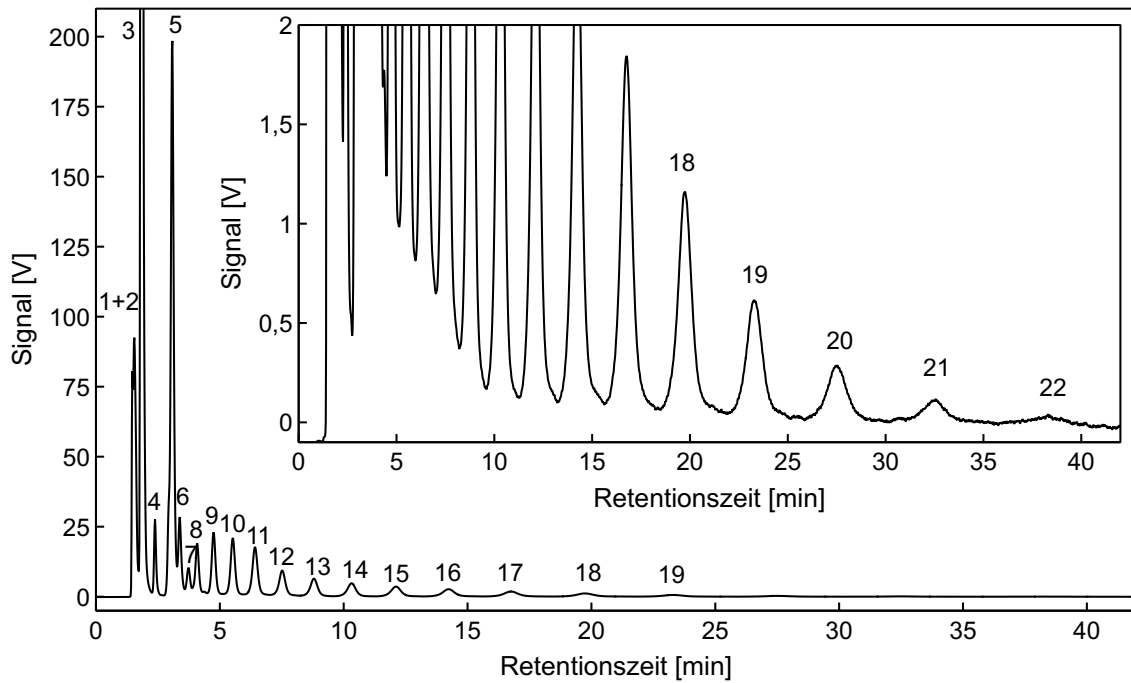
**Abbildung 11. Chromatogramm von aus Chicorée gewonnenen I-FOS in einer Konzentration von 50 mM.** 1: Fructose, 2: DP2, 3: DP3, 4: DP4, 5: DP5, 6: DP6, 7: DP7. HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] bei einer Flussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei  $40 \text{ °C}$  durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

Da diese I-FOS durch enzymatische Hydrolyse von pflanzlichem Inulin hergestellt werden, bestehen die Präparate aus einer Mischung von I-FOS mit (GFn-Typ) und ohne endständige Glucoseeinheit (Fn-Typ), wobei die I-FOS mit Fn-Struktur überwiegen (Abb. 2). Das Vorhandensein der beiden unterschiedlich strukturierten I-FOS wurde durch das Auftreten der Schultern der Peaks 5, 6 und 7 (DP5, DP6 bzw. DP7) sowie durch Asymmetrie der Peaks 2 und 4 (DP2 bzw. DP4) sichtbar. Somit konnten I-FOS des Fn-Typs nicht vollständig von I-FOS des GFn-Typs getrennt werden, die unterschiedlichen DPs wurden jedoch sehr gut voneinander getrennt (Abb. 11).

### **3.2.2 Enzymatische Synthese von I-FOS mit aufgereinigter Inulosucrase InuGB-V3 und deren Analyse mit der entwickelten HPLC-Methode**

Aufgrund früherer Studien (Anwar et al. 2010) wurde erwartet, dass die Inulosucrase InuGB-V3 auch I-FOS mit höheren DPs synthetisiert, als es bei den I-FOS die aus Chicorée gewonnen wurden beobachtet wurde (Abb. 11). Um zu untersuchen, ob die beschriebene isokratische HPLC-Methode für die Analyse von den Synthese-Produkten von InuGB-V3 geeignet ist, wurde aufgereinigte Inulosucrase in einem Enzymtest eingesetzt, bei dem  $345 \text{ g L}^{-1}$  des Substrats Saccharose zu I-FOS umgesetzt wurde.

Bei Anwendung der zuvor beschriebenen isokratischen HPLC-Methode auf Enzymtestproben wurde gezeigt, dass das Enzym in der Tat ein breites Spektrum an I-FOS erzeugte. Es wurden I-FOS mit einem DP bis zu 17 nachgewiesen (Abb. 12). Die drei I-FOS 1-Kestotriose, 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose konnten durch Vergleich mit kommerziellen Standards eindeutig identifiziert werden. Die folgenden Peaks eluieren in gleichmäßig ansteigenden Abständen, ohne dass ein Hinweis auf FOS eines anderen Bindungstyps oder des Fn-Typs zu erkennen war (Abb. 11, 12). Daher wurde ersichtlich, dass es sich bei den Peaks um I-FOS mit zunehmendem DP handelte, die aus der Transfructosylierung von 1,1,1-Kestopentaose (GF5-16) resultierten, wie dies in früheren Studien beschrieben wurde (Anwar et al. 2010). Ein weiteres Syntheseprodukt, das nicht dem Elutionsmuster von GFn-Typ I-FOS folgte, eluierte zwischen Saccharose und 1-Kestotriose (Abb. 12, Tabelle 16). Dabei handelte es sich höchstwahrscheinlich um ein Trisaccharid-Isomer von 1-Kestotriose, wie z. B. Neo-Kestose oder möglicherweise um das Disaccharid Inulobiose (Díez-Municio et al. 2013), das jedoch nur in sehr geringen Mengen vorlag. Produkte mit ähnlichen Elutionseigenschaften sind auch für andere Inulosucrasen beschrieben worden (Anwar et al. 2010; Ozimek et al. 2006b).



**Abbildung 12. Chromatogramm der InuGB-V3-Produkte nach 4 Stunden Inkubationszeit.** Das eingblendete Chromatogramm ist eine vergrößerte Ansicht desselben Chromatogramms, welches zur verbesserten Sichtbarkeit kleinerer Signale eingefügt wurde. Der Enzymassay wurde in einem 1,5-mL-Maßstab bei 37 °C mit 60 µg Protein in  $344,9 \pm 20,3 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt. 1+2: Injektionspeak, 3: Probenmatrix, 4: Glycerin (Probenmatrix, eingeführt über die Enzym-Elutionsfraktion), 5: Fructose/Glucose, 6: Saccharose, 7: nicht identifizierte Verbindung, 8: GF2, 9: GF3, 10: GF4, 11: GF5, 12: GF6, 13: GF7, 14: GF8, 15: GF9, 16: GF10, 17: GF11, 18: GF12, 19: GF13, 20: GF14, 21: GF15, 22: GF16. HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

Die Monosaccharide Fructose und Glucose wurden unvollständig aufgetrennt, wobei Fructose als vordere Schulter des Glucose-Peaks auftrat. Saccharose, die nicht identifizierte Verbindung und 1-Kestotriose waren ausreichend getrennt, mit Auflösungen  $\geq 1,3$  (Tabelle 16). Bei Verbindungen mit Auflösungen  $> 1$  beträgt die gegenseitige Überlappung der Peaks  $< 5 \%$ , basierend auf symmetrischen Peaks gleicher Höhe und Gauß'scher Verteilung. Bei Auflösungswerten  $\geq 1,5$  wird eine Basislinientrennung angenommen. Die auf 1-Kestotriose folgenden I-FOS wurden mit Auflösungen  $\geq 2,4$  basisliniengetreten (Tabelle 16), was ihre vollständige Auflösung unterstreicht. Alle Produkte wurden in weniger als 45 Minuten eluiert (Abb. 12).



**Tabelle 16. Retentionszeit und Auflösung der von InuGB-V3 synthetisierten Produkte nach 4 Stunden Inkubation.**

Substanz <sup>a)</sup>	Retentionszeit [min]	Auflösung R <sub>s</sub>
Glycerin <sup>b)</sup>	2,367	0,0
Fructose	2,933	- <sup>d)</sup>
Glucose	3,066	- <sup>d)</sup>
Saccharose	3,366	1,3
Unbekannt <sup>c)</sup>	3,716	1,4
1-Kestotriose	4,066	1,3
1,1-Kestotetraose	4,733	2,4
1,1,1-Kestopentaose	5,500	2,5
GF5	6,400	2,5
GF6	7,500	2,6
GF7	8,783	2,6
GF8	10,299	2,6
GF9	12,099	2,6
GF10	14,216	2,5
GF11	16,749	2,5
GF12	19,715	2,4
GF13	23,265	2,5
GF14	27,415	2,4
GF15	32,531	2,5
GF16	38,281	2,0

<sup>a)</sup>Der Enzymassay wurde in einem Maßstab von 1,5 ml bei 37 °C mit 60 µg Protein in 344,9 ± 20,3 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM CaCl<sub>2</sub> ausgeführt. Es wurden drei unabhängige Replikate analysiert, und eine repräsentative Probe ist abgebildet. Die HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH<sub>2</sub> unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von 0,6 mL min<sup>-1</sup> bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

<sup>b)</sup>Glycerin ist Teil der Probenmatrix und wurde über die Elutionsfraktion des Enzyms eingebracht

<sup>c)</sup>Nicht identifiziertes Produkt von InuGB-V3

<sup>d)</sup>Auflösung nicht angegeben, da zum einen die Trennung der Peaks unzureichend war und zum anderen das Fructose-Glucose-Peakpaar ein sehr großes Größenverhältnis aufwies, was eine zuverlässige Auflösungsberechnung verhinderte (Snyder et al. 2012).

### 3.2.3 Validierung der Methode

Um die Präzision der Methode zu untersuchen, wurde eine Probe des analysierten Inulosucrase-Assays dreimal an einem Tag injiziert, um die Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages (*Intraday*-Präzision) zu ermitteln, und an drei aufeinanderfolgenden Tagen, um die interne Laborpräzision (*Interday*-Präzision) zu bewerten. Die Werte der relativen Standardabweichung (RSD) wurden für die Retentionszeit (Tabelle 17) und die Peakfläche (Tabelle 18) aller nachgewiesenen Verbindungen berechnet.

**Tabelle 17. Intraday- und Interday-Präzision der Retentionszeit von Zuckern und I-FOS.**

Substanz <sup>a)</sup>	Intraday-Präzision (n = 3)		Interday-Präzision (n = 3)	
	Mittel ± sd <sup>d)</sup> [min]	RSD <sup>e)</sup> [%]	Mittel ± sd <sup>d)</sup> [min]	RSD <sup>e)</sup> [%]
Glycerin <sup>b)</sup>	2,37 ± 0,01	0,39	2,36 ± 0,01	0,4
Fructose	2,92 ± 0,02	0,57	2,91 ± 0,03	0,9
Glucose	3,03 ± 0,02	0,65	3,02 ± 0,04	1,4
Saccharose	3,31 ± 0,02	0,58	3,31 ± 0,05	1,5
Unbekannt <sup>c)</sup>	3,64 ± 0,01	0,27	3,64 ± 0,07	1,8
1-Kestotriose	3,97 ± 0,01	0,25	3,98 ± 0,08	2,1
1,1-Kestotetraose	4,58 ± 0,02	0,37	4,60 ± 0,1	2,7
1,1,1-Kestopentaose	5,28 ± 0,02	0,32	5,32 ± 0,2	3,1
GF5	6,11 ± 0,02	0,31	6,16 ± 0,2	3,6
GF6	7,10 ± 0,03	0,41	7,18 ± 0,3	4,1
GF7	8,25 ± 0,03	0,35	8,36 ± 0,4	4,6
GF8	9,61 ± 0,03	0,36	9,76 ± 0,5	5,1
GF9	11,20 ± 0,04	0,40	11,39 ± 0,6	5,6
GF10	13,08 ± 0,06	0,44	13,33 ± 0,8	6,1
GF11	15,29 ± 0,08	0,55	15,62 ± 1,0	6,6
GF12	17,90 ± 0,1	0,56	18,31 ± 1,3	7,0
GF13	21,00 ± 0,1	0,61	21,50 ± 1,6	7,5
GF14	24,63 ± 0,2	0,59	25,24 ± 2,0	7,8
GF15	28,86 ± 0,1	0,49	29,66 ± 2,6	8,8
GF16	33,94 ± 0,4	1,17	34,94 ± 3,1	8,9

<sup>a)</sup>Gemessen wurde eine InuGB-V3-Probe, die nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C entnommen wurde (60 µg Protein in 344,9 ± 20,3 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM CaCl<sub>2</sub>, im Maßstab 1,5 mL). HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH<sub>2</sub> unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von 0,6 mL min<sup>-1</sup> bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

<sup>b)</sup>Glycerin ist Teil der Probenmatrix und wurde über die Elutionsfraktion des Enzyms eingebracht

<sup>c)</sup>Nicht identifiziertes Produkt von InuGB-V3

<sup>d)</sup>sd = Standardabweichung

<sup>e)</sup>RSD = relative Standardabweichung

Die Wiederholpräzision der Retentionszeit innerhalb eines Tages war für alle Verbindungen sehr gut, mit einer RSD < 0,7 % (nur DP17 RSD = 1,2 %). Bei den Messungen der *Interday*-Präzision nahm die RSD erwartungsgemäß zu. Für Verbindungen bis zu einem DP von 8 blieb die RSD < 5 %, mittel- und langkettige I-FOS zeigten höhere Werte von < 9 %. Es ist jedoch zu beachten, dass die I-FOS mit zunehmender Kettenlänge in abnehmender Konzentration vorhanden waren. Die Wiederholbarkeit der Peakflächen aller Verbindungen außer Fructose und DP17 lag bei < 4 %. Die Werte für der *Interday*-Präzision der Peakflächen dieser Substanzen lagen bei < 7 % (nur DP16 RSD = 8,7 %). Nur die Peakflächen-RSD-Werte von Fructose und des I-FOS mit DP17 waren sehr hoch mit 11,9 % bzw. 23,1 % (Fructose, *Intraday*- bzw. *Interday*-Präzision) und 33,6 % und 55,2 % (DP17, *Intraday*- bzw. *Interday*-Präzision).

**Tabelle 18. Intraday- und Interday-Präzision der Peakflächen von Zuckern und I-FOS.**

Substanz <sup>a)</sup>	Intraday-Präzision (n = 3)		Interday-Präzision (n = 3)	
	Mittel ± sd <sup>d)</sup> [min]	RSD <sup>e)</sup> [%]	Mittel ± sd <sup>d)</sup> [min]	RSD <sup>e)</sup> [%]
Glycerin <sup>b)</sup>	146858 ± 4790	3,3	147797 ± 5161	3,5
Fructose	185847 ± 22015	11,9	190114 ± 43863	23,1
Glucose	1584681 ± 18589	1,2	1638582 ± 33238	2,0
Saccharose	245700 ± 8059	3,3	263619 ± 12025	4,6
Unbekannt <sup>c)</sup>	99544 ± 1400	1,4	103626 ± 3103	3,0
1-Kestotriose	191756 ± 3779	2,0	199162 ± 6731	3,4
1,1-Kestotetraose	253972 ± 2764	1,1	263408 ± 8910	3,4
1,1,1-Kestopentaose	270515 ± 3749	1,4	280490 ± 7373	2,6
GF5	260995 ± 2460	0,9	273110 ± 9622	3,5
GF6	156738 ± 5288	3,4	162609 ± 10125	6,2
GF7	126573 ± 1994	1,6	130087 ± 4633	3,6
GF8	111231 ± 1285	1,2	115933 ± 3838	3,3
GF9	100476 ± 1030	1,0	103938 ± 2980	2,9
GF10	88912 ± 841	1,0	92128 ± 2170	2,4
GF11	73146 ± 494	0,7	75711 ± 2579	3,4
GF12	1047 ± 1047	1,9	58281 ± 1903	3,3
GF13	33579 ± 866	2,6	35275 ± 2347	6,7
GF14	19255 ± 378	2,0	19506 ± 557	2,9
GF15	7746 ± 289	3,7	8484 ± 736	8,7
GF16	2564 ± 862	33,6	3880 ± 2141	55,2

<sup>a)</sup>Gemessen wurde eine InuGB-V3-Assay-Probe, die nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C entnommen wurde (60 µg Protein in 344,9 ± 20,3 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM CaCl<sub>2</sub>, in einem Maßstab von 1,5 mL). HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und 0,6 mL min<sup>-1</sup> bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

<sup>b)</sup>Glycerin ist Teil der Probenmatrix und wurde über die Elutionsfraktion des Enzyms eingebracht

<sup>c)</sup>Nicht identifiziertes Produkt von InuGB-V3

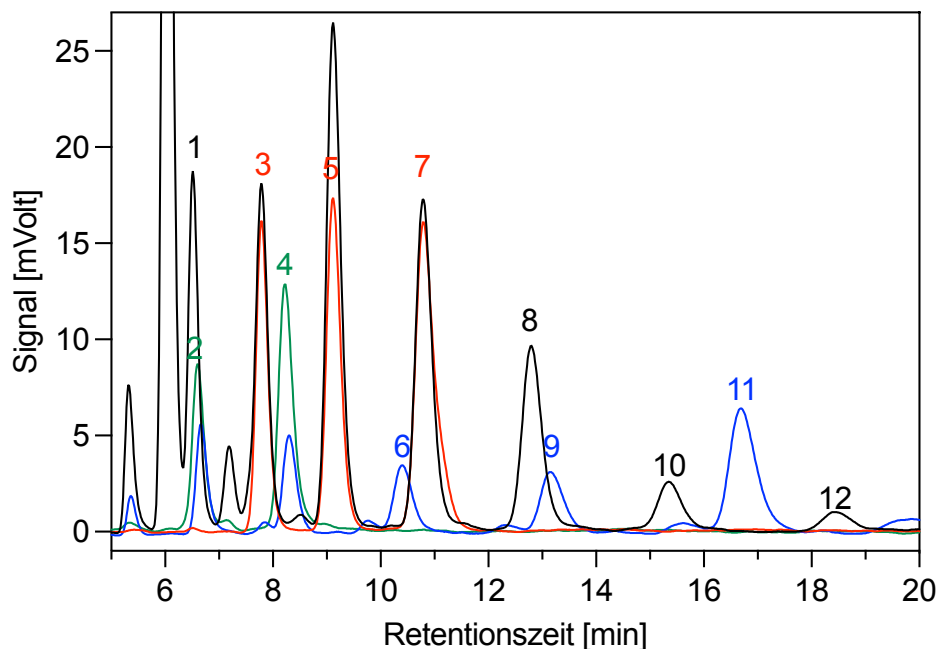
<sup>d)</sup>sd = Standardabweichung

<sup>e)</sup>RSD = relative Standardabweichung

### 3.2.4 Wechsel zur Polymer-basierten Aminophasen-Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E

Wie zuvor bei der Messung von bakteriellen L-FOS beobachtet wurde, besaß die Säule Eurospher II 100 NH2 eine nur kurze Lebensdauer, was sich in rasch abnehmenden Retentionszeiten der Substanzen und einem einhergehenden Verlust des Auflösungsvermögens äußerte (Hövels 2020). Dies ist ein bekannter Nachteil von Silica-basierten HPLC-Säulen, da das Silica-Packungsmaterial sensitiv gegenüber hohen pH-Werten reagiert (Tanaka et al. 2003). Aus diesem Grund wurde die HPLC-Säule Eurospher II 100 NH2 (Knauer GmbH) nach der Analyse der ersten I-FOS-Produktion mit aufgereinigter Inulosucrase durch die HPLC-Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E (Showa Denko

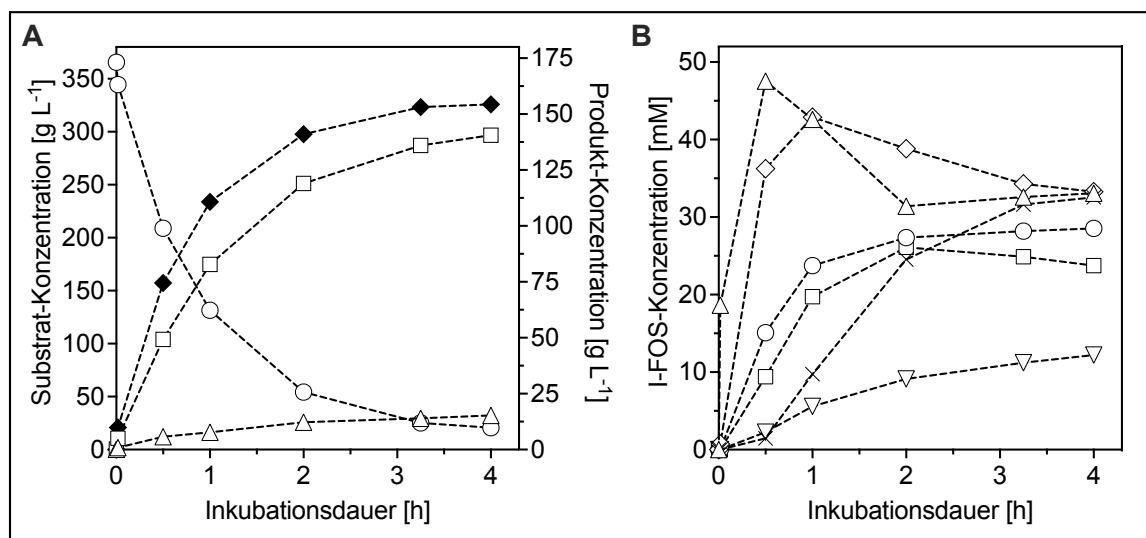
K. K.) ersetzt. Diese Säule hatte sich ebenfalls geeignet zur Analyse von L-FOS gezeigt (Hövels 2020). Auch diese Säule ist eine Aminophasen-Säule, die jedoch über Polymer-basiertes Packungsmaterial aus Polyvinylalkohol verfügt. Damit zeichnet sich diese HPLC-Säule im Vergleich zur Silica-basierten Säule Eurospher II 100 NH<sub>2</sub> durch äußerste Robustheit und Stabilität aus, was die Nutzungsdauer deutlich verlängerte. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Testmessungen mit verschiedenen FOS durchgeführt. Es kamen kommerzielle I-FOS Standards (GFn-Typ), mit InuGB-V3 synthetisierte I-FOS, Levanbiose- und Levantriose-Standards sowie eine Mischung enzymatisch synthetisierter L-FOS (Pohlentz et al. 2022) zum Einsatz. Die Testmessungen zeigten, dass mit ähnlichen Acetonitril-Konzentrationen und Laufmittelraten ebenso gute Ergebnisse erzielt werden konnten wie mit der bisherigen HPLC-Säule (Abb. 12, Abb. 13). So wurden auch mit dieser Säule die auf 1-Kestotriose (GF2) folgenden I-FOS basisliniengetrennt. Zudem konnte zwischen I-FOS, L-FOS und FOS vom Fn oder GFn-Typ unterschieden werden (Abb. 13).



**Abbildung 13. Unterscheidung verschiedener FOS-Typen mittels HPLC-Analyse.** (—): Prozesslösung der I-FOS-Produktion im 10-L-Maßstab aus 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose unter Verwendung von InuGB-V3-Rohenzym. (—): I-FOS-Standards des GFn-Typs (Megazyme, Inc.). (—): L-FOS Standards des Fn-Typs (Megazyme, Inc.). (—): L-FOS des Fn + GFn-Typs (hergestellt wie in Pohlentz et al. 2022 beschrieben, zur Verfügung gestellt von Joana Pohlentz). 1: Saccharose, 2: Levanbiose (F2), 3: 1-Kestotriose (GF2), 4: Levantriose (F3), 5: 1,1-Kestotetraose (GF3), 6: L-FOS F4, 7: 1,1,1-Kestopentaose (GF4), 8: I-FOS GF5, 9: L-FOS F5, 10: I-FOS GF6, 11: L-FOS F6, 12: I-FOS GF7. Die verschiedenen FOS wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> analysiert.

### 3.3 Enzymatischen Synthese von I-FOS mit aufgereinigter InuGB-V3

Die entwickelte HPLC-Methode ermöglichte die quantitative Analyse des Substratumsatzes und der Produktbildung während der enzymatischen I-FOS-Produktion mit rekombinanter InuGB-V3. Während der enzymatischen Reaktion bei 37 °C wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, um die Umwandlung von Saccharose in Fructose, Glucose und I-FOS zu untersuchen. Die aufgereinigte Inulosucrase InuGB-V3 erzielte eine I-FOS-Ausbeute von  $146,2 \pm 7,4 \text{ g L}^{-1}$  aus  $344,9 \pm 20,3 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose innerhalb von 4 Stunden.

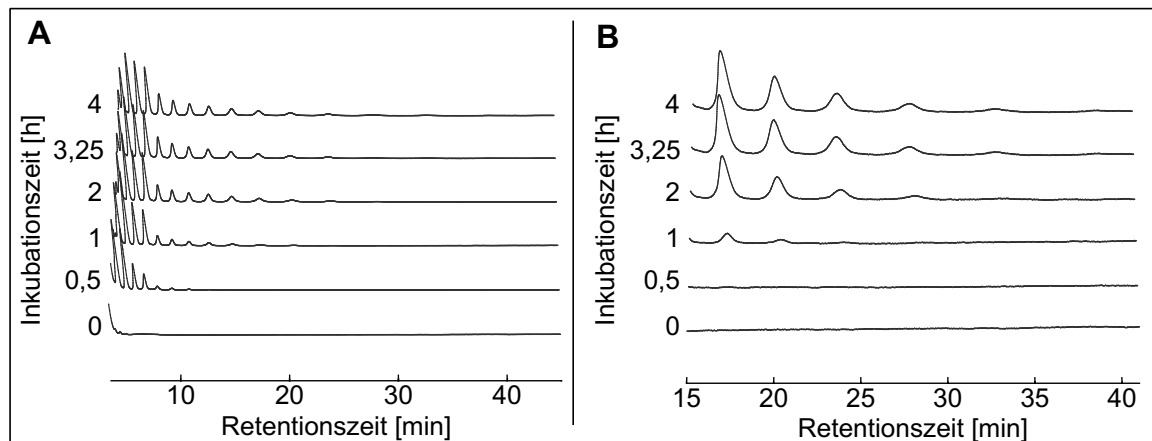


**Abbildung 14. I-FOS-Produktionsprozess aus  $345 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose durch aufgereinigte InuGB-V3.** (A) Umwandlung von Saccharose (○) in die Produkte I-FOS (◆), Glucose (□) und Fructose (△). (B) Verlauf der Synthese der einzelnen I-FOS GF2 (△), GF3 (◇), GF4 (○), GF5 (□), GF6 (▽) und GF7-16 (×). Der Enzymassay wurde in einem 1,5-mL-Maßstab bei 37 °C mit 60 µg Protein in  $344,9 \pm 20,3 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ausgeführt. Es wurden drei unabhängige Replikate analysiert, und eine repräsentative Probe ist abgebildet. Die HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

Die Analyse der Produktionskinetik der Enzymtests ergab, dass die verfügbare Saccharose schnell umgesetzt wurde (Abb. 14A). Nach 4 Stunden war der Produktionsprozess weitgehend abgeschlossen, wobei  $93,7 \pm 1,9 \%$  des Substrats bereits abgebaut waren. Die Menge der verbleibenden Saccharose nahm in den nächsten zwei Stunden nicht wesentlich ab. Die Geschwindigkeit der Substrathydrolyse, die sich in der Fructose-Freisetzung widerspiegelte, blieb während des gesamten Reaktionsprozesses niedrig (Abb. 14A). Nach 4 Stunden waren  $7,9 \pm 0,5 \%$  des Saccharose Umsatzes auf Hydrolyse zurückzuführen.

Zu Beginn der Reaktion wurden hauptsächlich kurzkettige I-FOS gebildet, die mit zunehmender Reaktionszeit allmählich verlängert wurden (Abb. 14B, 15). Mit der Entstehung längerer I-FOS und

dem Anstieg ihrer Konzentration nahm die Konzentration der kurzkettigen I-FOS leicht ab, insbesondere die von 1-Kestotriose und 1,1-Kestotetraose (Abb. 15B).



**Abbildung 15. Chromatogramme der I-FOS-Produktion in einem Zeitraum von 4 h. (A)** Elutionsprofil von Minute 3,6 - 45 (nur I-FOS, beginnend mit der nicht identifizierten Substanz nach 3,7 min, Tabelle 17). **(B)** Chromatogramm-Ausschnitte von Minute 15 - 41, vergrößert mit einem Vergrößerungsfaktor von 20. Der Enzymassay wurde in einem 1,5-mL-Maßstab bei 37 °C mit 60 µg Protein in  $344,9 \pm 20,3 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ausgeführt. Die HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH2 unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor. Es wurden drei unabhängige Replikate analysiert, und eine repräsentative Probe ist abgebildet.

Während der gesamten Reaktion blieben die I-FOS GF2-5 die Hauptprodukte. Insgesamt konnten hohe Mengen an I-FOS erzielt werden. Nach 4 h wurden neben Fructose ( $13,4 \pm 1,9 \text{ g L}^{-1}$ ) und Glucose ( $144,9 \pm 4,5 \text{ g L}^{-1}$ )  $146,2 \pm 7,4 \text{ g L}^{-1}$  I-FOS gebildet (Ausbeute:  $0,42 \pm 0,02 \text{ g g}^{-1}$  Substrat). Die schnelle Substratumwandlungsrate spiegelte sich in der Produktivität von  $36,6 \pm 1,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wider. Basierend auf der Massenkonzentration bestanden die I-FOS hauptsächlich aus GF3, 4 und 5, die in gleichen Mengen von  $22,6 \pm 1,3$ ,  $23,7 \pm 0,2$  bzw.  $23,4 \pm 1,9 \text{ g L}^{-1}$  verfügbar waren, was einem Anteil von je 16 % an allen I-FOS entsprach. I-FOS mit höheren DPs wurden in abnehmenden Mengen synthetisiert (Tabelle 19). Aufgrund ihres höheren Molekulargewichts machten die I-FOS mit DPs von acht oder mehr dennoch einen Anteil von 31 % aller I-FOS in der Prozesslösung aus. Neben Saccharose konnten keine weiteren Disaccharide mittels HPLC nachgewiesen werden. Abgesehen von der verbleibenden Saccharose und den Monosacchariden handelte es sich also bei allen Produkten um Ballaststoffe im Sinne der EU-Norm, da die Verbindungen aus drei oder mehr monomeren Einheiten bestanden (Verordnung Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments).

**Tabelle 19. Lösliche Produkte von InuGB-V3 nach 4 Stunden Inkubationszeit.**

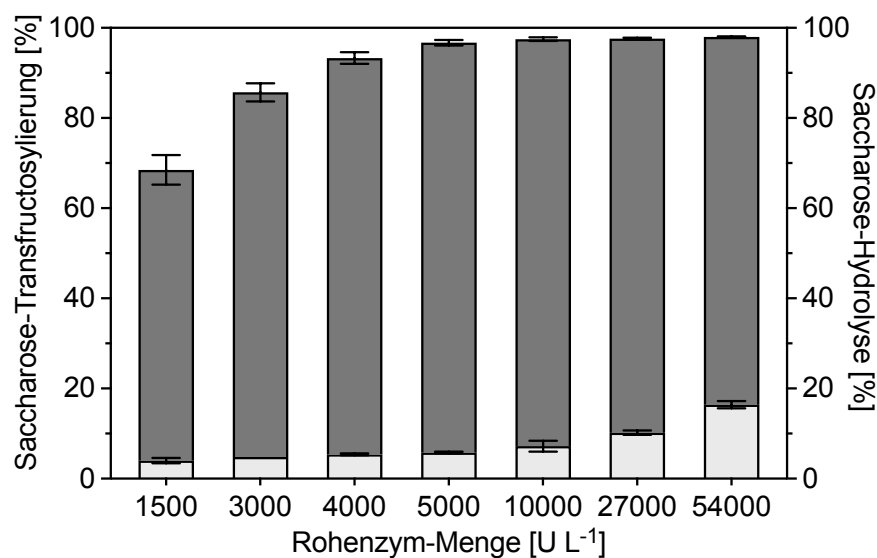
Substanz	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ] <sup>a)</sup>
Fructose	13,4 ± 1,9
Glucose	144,9 ± 4,5
GF2	17,1 ± 0,5
GF3	22,6 ± 1,3
GF4	23,7 ± 0,2
GF5	23,4 ± 1,9
GF6	14,3 ± 1,8
GF7	11,0 ± 1,1
GF8	9,1 ± 0,6
GF9	7,6 ± 1,2
GF10	6,4 ± 1,5
GF11	4,5 ± 1,6
GF12	3,2 ± 1,5
GF13	1,7 ± 1,1
GF14	1,0 ± 0,6
GF15	0,4 ± 0,4
GF16	0,2 ± 0,3
Summe I-FOS	146,2 ± 7,4

<sup>a)</sup>Die Ansätze wurden in drei unabhängigen Replikaten in einem Maßstab von 1,5 ml bei 37 °C mit 60 µg Protein in 344,9 ± 20,3 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM CaCl<sub>2</sub> ausgeführt. HPLC-Messungen wurden mit der Säule Eurospher II 100 NH<sub>2</sub> unter Einsatz von 60 % Acetonitril [v/v] und einer Flussrate von 0,6 mL min<sup>-1</sup> bei 40 °C durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem RI-Detektor.

In der Substrat-Produkt-Bilanz wurde deutlich, dass ein kleiner Anteil der Fructose-Monomere aus dem Substrat Saccharose nicht in den Endprodukten (I-FOS, freie Fructose, Rest-Saccharose) gefunden wurde. Es war anzunehmen, dass diese fehlenden Fructose-Monomere zu polymerem Inulin mit unbekannter Kettenlänge transfructosyliert wurden, da für InuGB bekannt ist, dass das Enzym auch hochmolekulares Inulin synthetisiert (Anwar et al. 2010, Ni et al. 2018). Das polymere Inulin präzipitierte bei der Probenahme in 77% [v/v] Ethanol-Lösungen und wurde als weißes Pellet sichtbar. Aus der geringeren Löslichkeit lässt sich schließen, dass es einen höheren DP als die im Überstand detektierten I-FOS hatte und daher als polymeres Inulin bezeichnet wurde. Dieses Produkt wurde nicht direkt quantifiziert, aber eine indirekte Berechnung auf der Grundlage der Saccharose-Umwandlung deutete darauf hin, dass etwa 26,5 ± 9,2 g L<sup>-1</sup> hochmolekulares Inulin produziert worden sein musste (nur Fructose-Anteile). Somit handelte es sich bei den meisten Transfructosylierungsprodukten von InuGB-V3 (84,8 ± 4,8 %) um I-FOS.

### 3.4 Charakterisierung des InuGB-V3-Rohenzym

Nachdem in dem ersten Enzymassay mit aufgereinigter Inulosucrase festgestellt wurde, dass die Inulosucrase ein großes Potential zur I-FOS-Produktion aufwies, sollte im Folgenden die Produktausbeute und die Effizienz des Produktionsprozesses erhöht werden. Zu diesem Zweck wurde Rohenzym anstelle von aufgereinigter Inulosucrase in den Biokonversionen eingesetzt, da hierdurch teure Aufreinigungsschritte umgangen werden, was die Produktionskosten senkt und die Wirtschaftlichkeit des Prozesses verbessert. Des Weiteren war die Optimierung der grundlegenden Parameter des I-FOS-Produktionsprozesses von größter Bedeutung, um die Transfructosylierungs-Aktivität des Enzyms und die Produktausbeute zu erhöhen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Inkubationstemperatur, des pH-Werts und der zweiwertigen Kationen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  auf die Umwandlung von Saccharose durch die Aktivität des InuGB-V3-Rohenzym untersucht.



**Abbildung 16. Erforderliche Menge an InuGB-V3-Rohenzym zur Umsetzung von 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose innerhalb von 24 h.** Es wurde die Transfructosylierung (■) und Hydrolyse (□) des Substrats Saccharose durch verschiedene Mengen des InuGB-V3-Rohenzym analysiert. Das Rohenzym (1.500 - 54.000 U L<sup>-1</sup>) wurde zu vorgewärmten Lösungen aus 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose mit 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) und 1 mM CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Die Aktivitätstests wurden in biologischen Triplikaten bei 37 °C im 1-mL-Maßstab durchgeführt. Die Saccharose- und Fructose-Konzentrationen wurden vor und nach 24 h Reaktionszeit mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 65 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 1 mL min<sup>-1</sup> bestimmt.

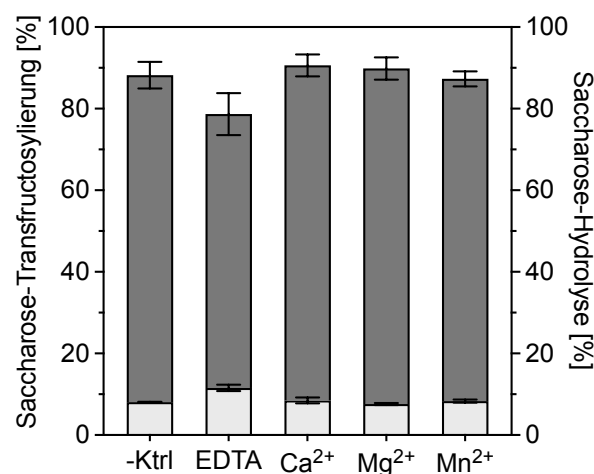
Die Umwandlung von Saccharose zu I-FOS und der Anteil der Saccharose-Hydrolyse wurden durch die Analyse der Saccharose- und Fructose-Konzentrationen in Enzym-Assays mittels isokratischer HPLC untersucht. Im ersten Schritt wurde ermittelt, welche Enzymmenge erforderlich war um



90 % des Substrates ( $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) innerhalb von 24 Stunden umzusetzen (Abb. 16). Mit einer Rohenzym-Menge von  $\leq 3000 \text{ U pro L Reaktionsvolumen}$  (Gesamtaktivität) konnten nur  $\leq 86 \%$  des Substrates umgesetzt werden.  $4000 \text{ U pro L Reaktionsvolumen}$  (Gesamtaktivität) reichten hingegen aus, um 90 % des Substrates umzuwandeln. Durch die Steigerung der Enzymmenge auf  $5000 \text{ U L}^{-1}$  wurde eine Saccharose-Umsetzung von 97 % erzielt. Mit zunehmenden Rohenzym-Mengen wurde die Saccharose-Umsetzung nicht weiter erhöht, lediglich die Saccharose-Hydrolyse nahm zu. Da möglichst wenig Enzym in dem I-FOS-Produktionsprozess verwendet werden sollte, wurden in den folgenden Experimenten routinemäßig  $4000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym mit einer Saccharose-Konzentration von  $570 \text{ g L}^{-1}$  verwendet.

### 3.4.1 Einfluss von Ionen

Der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  sowie von EDTA auf die Saccharose-Umwandlung wurden analysiert. Es wurde festgestellt, dass die Zugabe von  $1 \text{ mM EDTA}$  zu einer Verringerung der Saccharose-Transfructosylierung durch InuGB-V3-Rohenzym um  $14,7 \pm 3,7 \%$  führte (Abb. 17). Außerdem war die Saccharose-Hydrolyse um  $43,5 \pm 11,8 \%$  erhöht. Die nachteiligen Auswirkungen waren wahrscheinlich auf das Abfangen von  $\text{Ca}^{2+}$  durch EDTA vom Enzym zurückzuführen (Anwar et al. 2010).

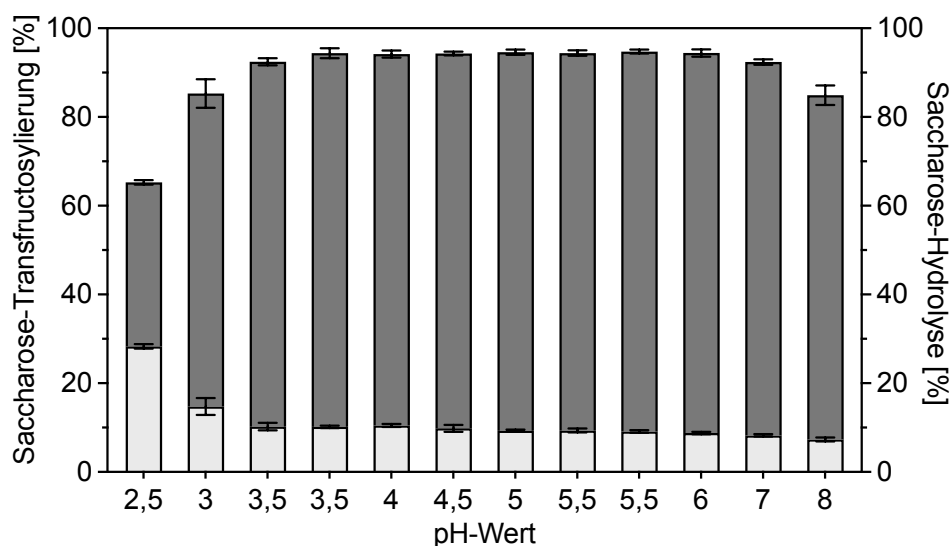


**Abbildung 17. Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und EDTA auf die Transfructosylierung (■) und Hydrolyse (□) von Saccharose durch InuGB-V3-Rohenzym.**  $4000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym wurde zu vorgewärmten Lösungen aus  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose,  $25 \text{ mM}$  Natriumacetatpuffer ( $\text{pH } 4,6$ ) und  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$  oder EDTA, gegeben. Die Aktivitätstests wurden in biologischen Triplikaten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im  $1\text{-mL}$ -Maßstab durchgeführt. Die Saccharose- und Fructose-Konzentrationen vor und nach 24 h Reaktionszeit wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit  $65 \%$  [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.

Die Zugabe von 1 mM der zweiwertigen Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von InuGB-V3-Rohenzym. Da sich  $Ca^{2+}$  in vorherigen Studien als vorteilhaft für die Enzymaktivität erwiesen hat (Anwar et al. 2010), wurde allen Reaktionen 1 mM  $CaCl_2$  zugesetzt, um eine vollständige Beladung der Enzymmoleküle in den folgenden Experimenten sicherzustellen.

### 3.4.2 Einfluss des pH-Wertes

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Saccharose-Umsetzung durch Inulosucrase-Rohextrakt zu untersuchen, wurden Enzymreaktionen bei pH-Werten zwischen pH 2,5 und pH 8 durchgeführt. Dieses breite pH-Spektrum wurde durch den Einsatz von drei unterschiedlichen Puffern (pH 2,5 – 3,5: Citronensäure-Natriumphosphat-Puffer; pH 3,5 – 5,5: Natriumacetat-Puffer; pH 5,5 – 8: Kaliumphosphat-Puffer) ermöglicht. Der Einfluss der Puffersubstanzen auf die Aktivität wurde bestimmt, indem ein Test mit Citronensäure-Natriumphosphat-Puffer und einer mit Natriumacetat-Puffer bei pH 3,5 durchgeführt wurde. Dasselbe galt für die Bestimmung der Aktivität bei pH 5,5, wo sowohl Natriumacetat-Puffer als auch Kaliumphosphat-Puffer verwendet wurde.

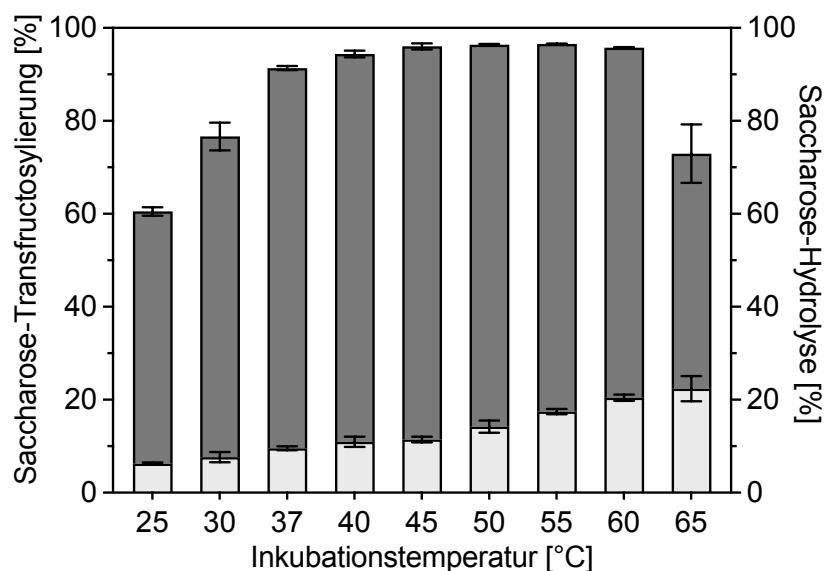


**Abbildung 18. Bestimmung des optimalen pH-Werts für die Saccharose-Umwandlung durch InuGB-V3-Rohenzym.** Der Einfluss des pH-Wertes auf die Transfructosylierung (■) und Hydrolyse (□) von Saccharose durch InuGB-V3-Rohenzym wurde nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Die Aktivitätstests wurden in biologischen Triplikaten im Maßstab von 1 mL bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4000 U L<sup>-1</sup> InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen aus 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose und 1 mM  $CaCl_2$  gestartet. Zum Einstellen der pH-Werte wurde 25 mM Citronensäure-Natriumphosphat-Puffer (pH 2,5 - 3,5), 25 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5 - 5,5) oder 25 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 5,5 - 8,0) verwendet. Die Saccharose- und Fructose-Konzentrationen vor und nach 24 h Reaktionszeit wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 65 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 1 mL min<sup>-1</sup> bestimmt.

InuGB-V3-Rohenzym zeigte ein breites optimales pH-Spektrum zwischen pH 3,5 und pH 6,0 (Abb. 18). Innerhalb dieses pH-Bereichs lag der Gesamtverbrauch an Saccharose während des beobachteten Zeitraums bei  $94,2 \pm 0,9 \%$ , und der Anteil der Saccharose-Hydrolyse war gering ( $9,7 \pm 0,6 \%$ ). Bei höheren pH-Werten nahm die Gesamtaktivität ab. Bei niedrigeren pH-Werten wurde ein Rückgang der Saccharose-Transfructosylierung und ein Anstieg der Saccharose-Hydrolyse beobachtet (Abb. 18). Daher wurde in den folgenden Assays ein 25 mM Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 verwendet.

### 3.4.3 Einfluss der Temperatur

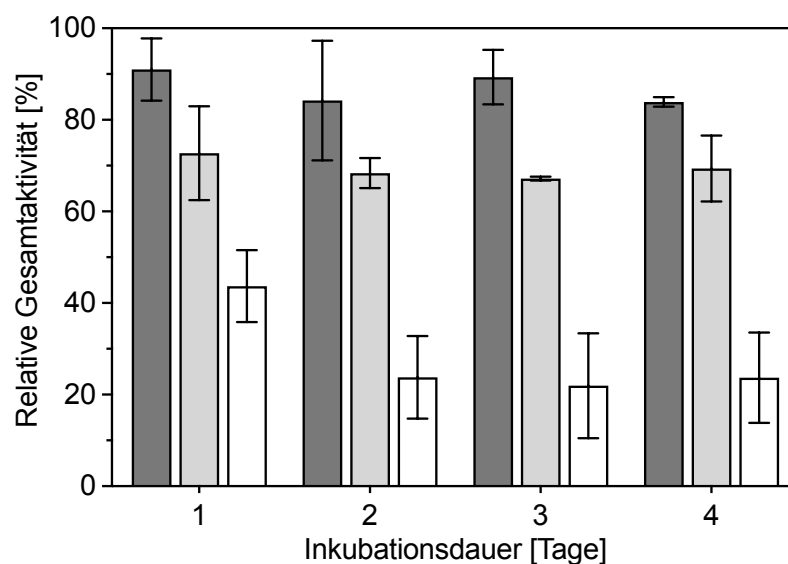
Von 25 °C auf 45 °C verbesserte sich der Saccharose-Umsatz innerhalb einer Inkubationszeit von 24 h von  $60,5 \pm 0,9 \%$  auf  $96,0 \pm 0,7 \%$ , während die Saccharose-Hydrolyse von  $6,2 \pm 0,2 \%$  auf  $11,4 \pm 0,6 \%$  anstieg (Abb. 19). Zwischen 50 °C und 60 °C blieb der Saccharose-Verbrauch bei etwa 96 % stabil, die Saccharose-Hydrolyse stieg jedoch auf  $20,4 \pm 0,7 \%$ . Bei 65 °C war die Saccharose-Umwandlung reduziert, was wahrscheinlich auf die Hitzeinaktivierung des Enzyms zurückzuführen war. Somit erschienen Inkubationstemperaturen zwischen 40 und 45 °C optimal für die I-FOS-Produktion, da bei diesen Temperaturen ein guter Kompromiss zwischen hoher Aktivität und geringer Saccharose-Hydrolyse erzielt wurde.



**Abbildung 19. Bestimmung der optimalen Temperatur für die Saccharose-Umwandlung durch InuGB-V3-Rohenzym.** Der Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen (25 - 65 °C) auf die Transfructosylierung (■) und Hydrolyse (□) von Saccharose durch InuGB-V3-Rohenzym wurde nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Die Aktivitätstests wurden in biologischen Triplikaten im Maßstab von 1 mL durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von  $4000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen aus  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  gestartet. Die Saccharose- und Fructose-Konzentrationen vor und nach 24 h Reaktionszeit wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 65 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.

### 3.4.4 Temperaturstabilität

Um die beste Inkubationstemperatur für die I-FOS-Produktion zu ermitteln, wurde die Stabilität des Rohenzym bei 40 °C, 45 °C und 50 °C analysiert (Abb. 20). Sterilfiltrierte Präparationen des InuGB-V3-Rohenzym wurde für vier Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die alle 24 Stunden entnommenen Enzymproben wurden für die anschließenden Aktivitätsuntersuchungen verwendet. Die während der Enzymreaktion freigesetzte Glucose-Menge (die sowohl die Transfructosylierung als auch die hydrolytische Aktivität widerspiegelt) wurde mit einem GOPOD-Assay (Megazyme Inc.) analysiert, um die Restaktivität der Inulosucrase zu bestimmen (Kapitel 2.6.3). Es zeigte sich, dass das InuGB-V3-Rohenzym bei 40 °C eine ausgezeichnete Stabilität aufwies, da die nachgewiesene Aktivität nach vier Tagen der Inkubation nur um  $16,1 \pm 1,0$  % abnahm (Abb. 20). Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität bei einer Inkubationstemperatur von 45 °C innerhalb desselben Zeitraums um  $30,6 \pm 7,2$  % ab. Bei 50 °C war die Aktivität nach 24 Stunden um  $56,3 \pm 7,8$  % und nach 4 Tagen weiter um  $76,3 \pm 9,9$  % reduziert. Aufgrund der hohen Langzeitstabilität bei 40 °C wurde diese Temperatur für nachfolgende Biokonversionen mit InuGB-V3-Rohenzym gewählt.



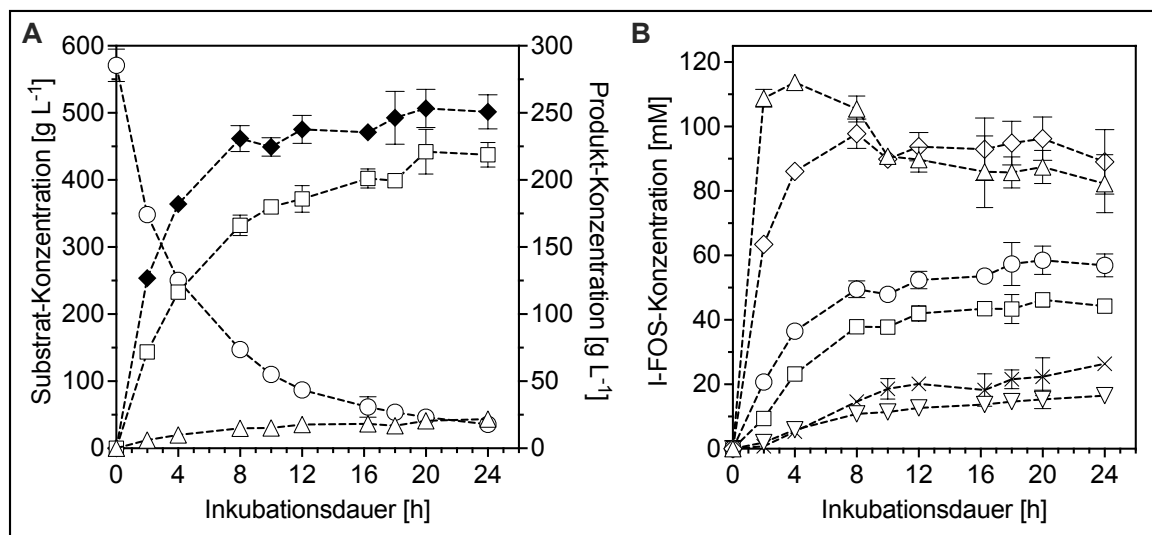
**Abbildung 20. Temperaturstabilität des InuGB-V3-Rohenzym.** Die verbleibende Gesamtaktivität der rohen Inulosucrase nach Inkubation bei 40 °C (■), 45 °C (▒) oder 50 °C (□) wurde 4 Tage lang alle 24 Stunden bestimmt und mit der Ausgangsaktivität verglichen. InuGB-V3-Rohenzym wurde in 1 ml 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) auf eine Volumenaktivität von 667 U verdünnt, sterilfiltriert und 4 Tage lang bei 40 °C, 45 °C oder 50 °C inkubiert. Es wurden Proben (6 µl) entnommen und Aktivitätstests in biologischen Duplikaten bei 40 °C in 1-mL-Assays mit 570 g L<sup>-1</sup> Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und 1 mM CaCl<sub>2</sub> durchgeführt. Innerhalb von 30 min wurden Proben in regelmäßigen Abständen entnommen. Der Anstieg der Glucosekonzentration, der die Gesamtaktivität der Inulosucrase (Hydrolyse und Transfructosylierung) widerspiegelt, wurde mit individuellen GOPOD-Assays (Megazyme Inc.) bewertet.

## 3.5 Produktion von I-FOS mit InuGB-V3-Rohenzym unter optimierten Bedingungen

### 3.5.1 Analyse der I-FOS-Produktion

Unter Verwendung der neu festgelegten Versuchsbedingungen (Kapitel 3.4) wurde mit dem Inulosucrase-Rohenzym eine I-FOS-Produktion durchgeführt. Wie bei der Charakterisierung des Rohenzym wurde eine Saccharose-Konzentration von  $570 \text{ g L}^{-1}$  eingesetzt. Nach 18 Stunden Inkubation waren 90 % des Substrats umgewandelt (Abb. 21), sodass die Saccharose-Konzentration während der Biokonversion von  $570 \text{ g L}^{-1}$  auf  $50,2 \pm 10,4 \text{ g L}^{-1}$  reduziert wurde.

Wie in der ersten I-FOS-Synthese mit aufgereinigtem Enzym (Kapitel 3.3) beobachtet wurde, wurden kurzkettige I-FOS zu Beginn der Reaktion in großen Mengen synthetisiert, während I-FOS mit höherem DP im Laufe des Versuchs allmählich zunahm. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass das InuGB-V3-Rohenzym eine sehr geringe hydrolytische Aktivität gegenüber den Reaktionsprodukten aufwies.



**Abbildung 21. Herstellung von I-FOS aus  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose durch InuGB-V3-Rohenzym. (A)** Umwandlung von Saccharose ( $\circ$ ) in die Produkte I-FOS ( $\blacklozenge$ ), Glucose ( $\square$ ) und Fructose ( $\triangle$ ). **(B)** Verlauf der Synthese der einzelnen I-FOS GF2 ( $\triangle$ ), GF3 ( $\diamond$ ), GF4 ( $\circ$ ), GF5 ( $\square$ ), GF6 ( $\nabla$ ) und GF7-13 ( $\times$ ). Die Biokonversion wurde durch Zugabe von  $4000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym zu einer vorgewärmten Lösung aus  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose,  $25 \text{ mM}$  Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  gestartet. Die Reaktionen wurden in biologischen Triplikaten im Maßstab von  $1 \text{ mL}$  durchgeführt. Die Konzentrationen von Zuckern und I-FOS wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit  $58 \text{ \% [v/v]}$  Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.

Neben  $258,3 \pm 14,3 \text{ g L}^{-1}$  I-FOS waren nach 18 h Inkubation  $19,0 \pm 2,5 \text{ g L}^{-1}$  Fructose und  $207,4 \pm 14,9 \text{ g L}^{-1}$  Glucose gebildet worden (Abb. 21A, Tabelle 20). Das InuGB-V3-Rohenzym produzierte hauptsächlich 1,1-Kestotetraose (GF3) mit einer Konzentration von  $63,8 \pm 3,2 \text{ g L}^{-1}$ , was 25 % der gesamten Menge an I-FOS entsprach (Abb. 21B). 1-Kestotriose (GF2) wurde in der ersten Phase der Reaktion in hohen Mengen von  $58,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  gebildet. Im weiteren Verlauf der Reaktion sank die Konzentration aufgrund der sukzessiven Transfructosylierung durch InuGB-V3-Rohenzym auf  $43,6 \pm 1,9 \text{ g L}^{-1}$ . 1,1,1-Kestopentaose (GF4) wurde hauptsächlich in der ersten Reaktionsphase gebildet und betrug am Ende der Reaktion  $48,8 \pm 3,8 \text{ g L}^{-1}$  (19 % aller I-FOS). I-FOS mit einem höheren Polymerisationsgrad wurden mit Konzentrationen von  $45,1 \pm 2,3 \text{ g L}^{-1}$  (GF5),  $18,3 \pm 2,4 \text{ g L}^{-1}$  (GF6) und  $38,7 \pm 5,9 \text{ g L}^{-1}$  (GF7 - GF13) gefunden (Tabelle 20). Somit machten I-FOS mit DPs von acht oder mehr 15 % aller I-FOS in der Prozesslösung aus.

**Tabelle 20. Produktmengen der I-FOS-Produktionsreaktion ausgehend von  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose nach 18 Stunden Inkubation.**

Substanz	Konzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ] <sup>a)</sup>
Saccharose (initial)	$571,0 \pm 24$
Fructose	$19,0 \pm 2,5$
Glucose	$207,4 \pm 14,9$
Saccharose (final)	$50,2 \pm 10,4$
GF2	$43,6 \pm 1,9$
GF3	$63,8 \pm 3,2$
GF4	$48,8 \pm 3,8$
GF5	$45,1 \pm 2,3$
GF6	$18,3 \pm 2,4$
GF7	$12,2 \pm 2,0$
GF8	$9,1 \pm 1,4$
GF9	$7,6 \pm 1,1$
GF10	$5,2 \pm 0,9$
GF11	$3,2 \pm 0,6$
GF12	$1,3 \pm 0,6$
GF13	$0,1 \pm 0,2$
Polymeres Inulin	$20,9 \pm 3,6$

<sup>a)</sup>Die Biokonversionsreaktionen von Saccharose zu I-FOS wurden durch Zugabe von  $4000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen von  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose mit 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  gestartet. Die Reaktionen wurden im Triplikate bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  für 18 h durchgeführt. Die Saccharose- und Produktkonzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.

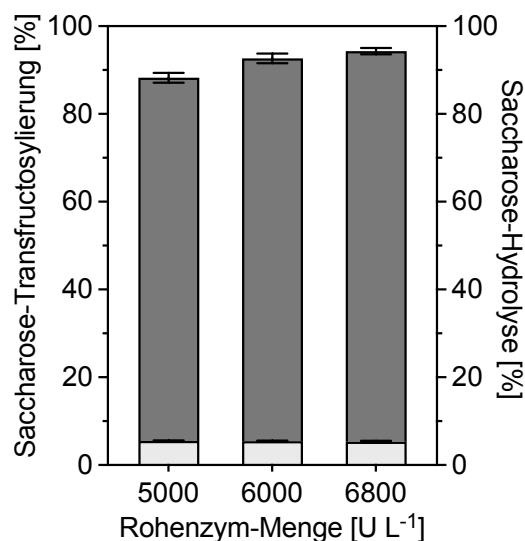
Zusätzlich zu den beschriebenen I-FOS mit kurzer (DP3-5) und mittlerer Kettenlänge (DP5-14) synthetisierte das InuGB-V3-Rohenzym auch geringe Mengen von polymerem Inulin, welches bei der Probennahme ausgefällt wurde. Zur Quantifizierung wurde das polymere Inulin mit einer

Mischung aus *endo*-Inulinase und *exo*-Inulinase (Fructanase Mixture, Megazyme Inc.) zu Fructose- und Glucose-Monomeren hydrolysiert. So wurde gezeigt, dass  $21,0 \pm 3,6 \text{ g L}^{-1}$  polymeres Inulin durch die rohe Inulosucrase synthetisiert wurden, was 7,5 % [w/w] an allen Transfructosylierungsprodukten entspricht. Insgesamt wurde im Vergleich zur ersten I-FOS-Synthese (mit  $345 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) ein geringerer Anteil an polymerem Inulin und langkettigen I-FOS synthetisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass  $73,9 \pm 7,2 \%$  der aus Saccharose freigesetzten Fructose-Einheiten in I-FOS eingebaut wurden, während sich  $5,7 \pm 0,9 \%$  in ausgefälltem Inulin befanden.  $6,3 \pm 0,9 \%$  der Fructose-Einheiten wurden als freie Fructose nachgewiesen, während  $8,8 \pm 1,8 \%$  in nicht-umgewandelter Saccharose gebunden blieben. Somit wurden 95 % der ursprünglichen Fructose-Einheiten in den Endprodukten nachgewiesen.

### 3.5.2 Upscaling der I-FOS-Produktion auf 10 L

Um die I-FOS-Titer zu maximieren, wurde die Substratkonzentration in den folgenden Experimenten auf  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose erhöht. Um die Skalierbarkeit der auf Rohenzym basierten I-FOS-Produktion zu bewerten, wurde die I-FOS-Synthese zudem mit  $800 \text{ g L}^{-1}$  Haushaltszucker in einem hochskalierten Reaktionsvolumen von 10 L durchgeführt.



**Abbildung 22. Erforderliche Menge an InuGB-V3-Rohenzym zur Umsetzung von  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose innerhalb von 24 h.** Es wurde die Transfructosylierung (■) und Hydrolyse (□) des Substrats Saccharose durch verschiedene Mengen des InuGB-V3-Rohenzym analysiert. Das Rohenzym ( $5.000 - 6.800 \text{ U L}^{-1}$ ) wurde zu vorgewärmten Lösungen aus  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, 25 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , hinzugefügt. Die Aktivitätstests wurden in biologischen Triplikaten bei  $40 \text{ °C}$  im 1-mL-Maßstab durchgeführt. Die Saccharose- und Fructose-Konzentrationen wurden vor und nach 24 h Reaktionszeit mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 65 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.

Für diesen Ansatz musste die Menge des InuGB-V3-Rohenzym erhöht werden (Abb. 22). Eine Gesamtaktivität von  $5000 \text{ U L}^{-1}$  Inulosucrase-Rohextrakt reichte nicht aus, um innerhalb von 24 h 90 % des Substrats umzusetzen. Dahingegen wurden mit  $6800 \text{ U L}^{-1}$  94 % der Saccharose verwertet. Da auch in diesem Ansatz so wenig Enzym wie möglich verwendet werden sollte, wurden in der hochskalierten I-FOS-Produktion  $6000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym eingesetzt, da unter diesen Bedingungen 90 % des Substrats innerhalb von 24 h umgewandelt wurden, sodass nur  $79,7 \pm 11,4 \text{ g L}^{-1}$  der Saccharose in der Prozesslösung verblieben.

Abgesehen von  $18,5 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$  Fructose und  $249,2 \pm 11,4 \text{ g L}^{-1}$  Glucose konnten I-FOS-Massekonzentrationen von  $400,5 \pm 6,5 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden, was auf eine starke Verbesserung der Produktbildung aus  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose im Vergleich zu einer Substratkonzentration von  $345 \text{ g L}^{-1}$  bzw.  $570 \text{ g L}^{-1}$  hinwies (Tabelle 21, 22). Zudem wurde die Ausbeute an I-FOS von  $0,42 \pm 0,02 \text{ g I-FOS pro g Saccharose}$  (Assay mit  $345 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) bzw.  $0,45 \pm 0,03 \text{ g I-FOS pro g Saccharose}$  (Assay mit  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) auf  $0,50 \pm 0,1 \text{ g I-FOS pro g Saccharose}$  (basierend auf dem Assay mit  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) verbessert. Die erhöhte initiale Saccharose-Konzentration führte darüber hinaus zu einer Verringerung der unerwünschten Saccharose-Hydrolyse, die von  $7,9 \pm 0,5 \%$  auf  $6,9 \pm 0,8 \%$  und schließlich auf  $4,9 \pm 0,4 \%$  gesenkt wurde.

**Tabelle 21. Produktmengen der I-FOS-Produktionsreaktion ausgehend von  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose im 10-Liter-Maßstab nach 20 h Inkubation.**

Substanz	Konzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ] <sup>a)</sup>
Saccharose (initial)	$799,1 \pm 54,5$
Fructose	$18,5 \pm 0,7$
Glucose	$249,2 \pm 11,2$
Saccharose (final)	$79,7 \pm 11,4$
GF2	$78,0 \pm 4,4$
GF3	$125,6 \pm 8,1$
GF4	$97,9 \pm 1,9$
GF5	$64,7 \pm 2,2$
GF6	$19,8 \pm 3,5$
GF7	$8,3 \pm 1,7$
GF8	$3,5 \pm 1,0$
GF9	$2,3 \pm 1,1$
GF10	$0,4 \pm 0,5$
Polymeres Inulin	$3,3 \pm 0,7$

<sup>a)</sup>Die Biokonversionsreaktionen von Saccharose zu I-FOS wurden durch Zugabe von  $6000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen von  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose mit  $25 \text{ mM}$  Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  gestartet. Die Reaktionen wurden im Triplikat bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 h durchgeführt. Die Saccharose- und Produktkonzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit  $58 \%$  [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.



Außerdem führte der Versuch mit  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose im Vergleich zu einer Ausgangskonzentration von  $345 \text{ g L}^{-1}$  bzw.  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose zu einer weiterführenden Verschiebung des Profils der Transfructosylierungs-Produkte (Abb. 14, 21, Tabelle 20, 21, 22). Insgesamt wurden kurzkettige I-FOS in höheren Mengen produziert als Produkte mit hohem DP. Während bei der Verwendung von  $345 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose als Substrat I-FOS mit einem DP von 3-17 und bei der Verwendung von  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose I-FOS mit einem DP von 3-14 nachgewiesen werden konnten, wurden bei der Produktion aus  $800 \text{ g L}^{-1}$  Substrat I-FOS mit DP3-11 beobachtet (Tabelle 22). Polymeres Inulin wurde durch Ethanolfällung und anschließende Lyophilisierung aus der Reaktionslösung im 10-Liter-Maßstab gewonnen. Das lyophilisierte polymere Inulin wurde gewogen und betrug  $32,9 \pm 6,7 \text{ g}$  pro 10 L. Somit wurde der Anteil des polymeren Inulins von 15,2 % (Assay mit  $345 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) auf 7,5 % (Assay mit  $570 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) und schließlich auf 0,8 % (Assay mit  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) aller Transfructosylierungs-Produkte reduziert. Dieses Ergebnis bestätigte, dass das InuGB-V3-Rohenzym unter optimierten Bedingungen nur geringe Mengen an polymerem Inulin synthetisiert.

**Tabelle 22. Einfluss der Substratkonzentration auf die I-FOS-Produktion mittels rekombinanter InuGB-V3.**

Saccharose-Konzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]	Saccharose-Hydrolyse [%]	I-FOS-Konzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]	I-FOS-Ausbeute [ $\text{g g}^{-1}$ ] <sup>a)</sup>	DP der I-FOS	Polymeres Inulin [%] <sup>b)</sup>
800 <sup>c)</sup>	$4,9 \pm 0,4$	$401 \pm 7$	$0,50 \pm 0,1$	3-11	0,8
570 <sup>c)</sup>	$6,9 \pm 0,8$	$258 \pm 14$	$0,45 \pm 0,03$	3-14	7,5
345 <sup>d)</sup>	$7,9 \pm 0,5$	$146 \pm 7,4$	$0,42 \pm 0,02$	3-17	15

<sup>a)</sup>Basierend auf der initialen Menge an Saccharose [w/w].

<sup>b)</sup>Anteil an allen Transfructosylierungs-Produkten [w/w].

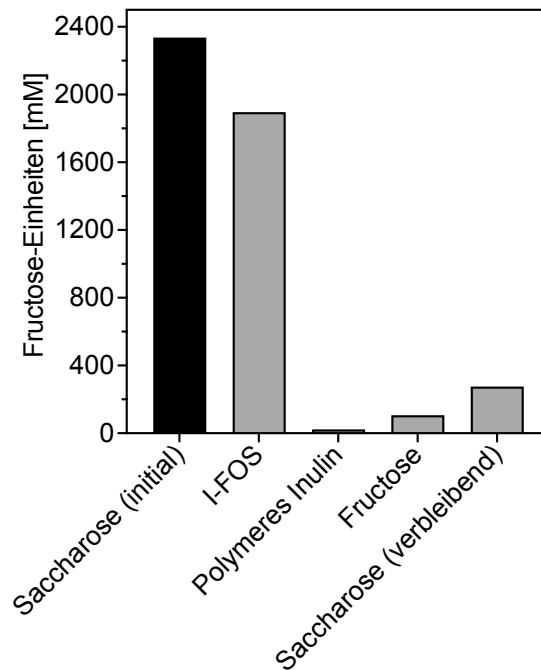
<sup>c)</sup>Produktionsprozess basierend auf InuGB-V3-Rohenzym.

<sup>d)</sup>Produktionsprozess basierend auf aufgereinigter InuGB-V3.

In der 10-L-Reaktion wurden mehr als vier Kilogramm I-FOS synthetisiert und 79,3 % der Fructose-Einheiten von Saccharose wurden in den I-FOS-Produkten (GF2 - GF10) gefunden (Abb. 23). Die Konzentrationen von Fructose ( $102,6 \text{ mM}$ ) und Inulin ( $18,3 \text{ mM}$  Fructose-Äquivalente) waren gering (Abb. 23), was zeigte, dass das InuGB-V3-Rohenzym die Transfructosylierungs-Reaktion mit Saccharose oder kurzkettigen I-FOS als Akzeptoren gegenüber der Saccharose-Hydrolyse oder der Bildung von polymerem Inulin bevorzugt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aus der Biokonversionsreaktion im 10-Liter-Maßstab erhaltene Produktlösung aus  $4.005 \pm 65 \text{ g}$  I-FOS,  $32,9 \pm 6,7 \text{ g}$  Inulin,  $2.492 \pm 112 \text{ g}$  Glucose,  $797 \pm 114 \text{ g}$  Saccharose und  $185 \pm 7 \text{ g}$  Fructose bestand. Insgesamt wurden 94,6 % der Fructose-Einheiten und 92,9 % der Glucose-Einheiten aus dem

Substrat (Saccharose  $800 \text{ g L}^{-1}$ ) in den Produkten und in der restlichen Saccharose am Ende der Versuche gefunden.

Insgesamt bestand die aus der Biokonversionsreaktion im 10-Liter-Maßstab erhaltene Produktlösung aus  $53,5 \pm 0,6 \%$  I-FOS,  $0,5 \pm 0,1 \%$  polymerem Inulin,  $32,4 \pm 1,0 \%$  Glucose,  $11,0 \pm 1,8 \%$  Saccharose und  $2,6 \pm 0,1 \%$  Fructose.



**Abbildung 23. Effizienz der Transfructosylierung durch das InuGB-V3-Rohenzym.** Die Grafik veranschaulicht die Übertragung der in der ursprünglich eingesetzten Saccharose enthaltenen Fructose-Einheiten (■) in die Produkte (▣) im 10-Liter-Produktionsprozess. Die hochskalierte Biokonversionsreaktion von Saccharose zu I-FOS wurde durch Zugabe von  $6000 \text{ U L}^{-1}$  InuGB-V3-Rohenzym zu vorgewärmten Lösungen aus  $800 \text{ g L}^{-1}$  Haushaltszucker (Saccharose),  $25 \text{ mM}$  Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  gestartet. Die Reaktionen wurden in vier Wiederholungen bei  $40 \text{ °C}$  für  $20 \text{ h}$  in einem 10-Liter-Maßstab durchgeführt. Die Konzentrationen der Saccharide wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit  $58 \%$  [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  bestimmt.

### 3.6 Aufreinigung der produzierten I-FOS mittels Aktivkohle

Ein Merkmal der enzymatischen Synthese von FOS aus Saccharose ist das Anfallen von großen Mengen an Nebenprodukten in der Prozesslösung. Aufgrund der Transfructosylierungs-Reaktion werden notwendigerweise große Mengen an Glucose freigesetzt. Zudem werden im Rahmen der Hydrolyse-Reaktion kleine Mengen an Fructose frei und es verbleibt ein Rest an nichtreagierter

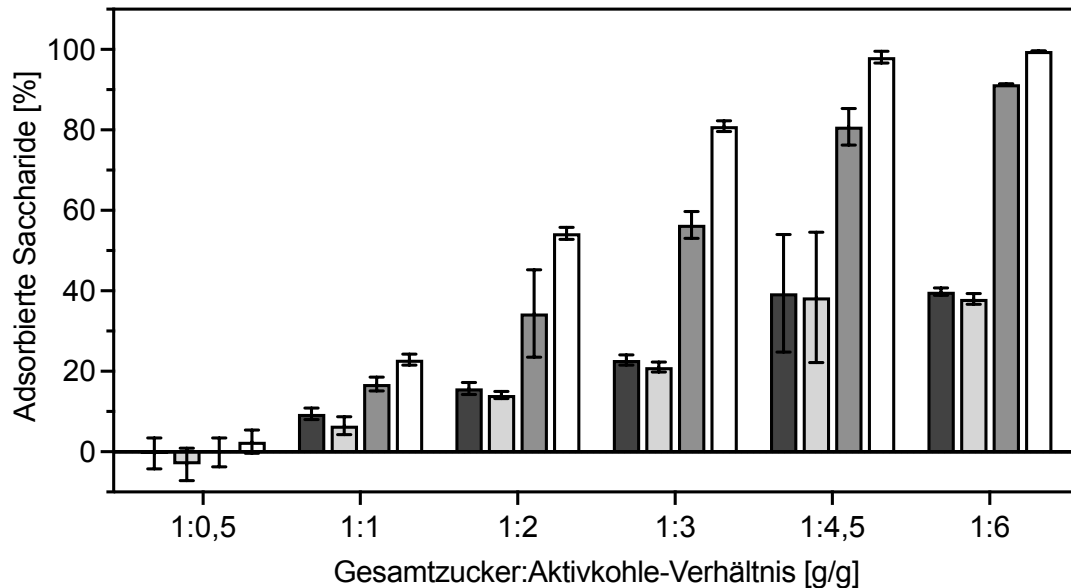
Saccharose. Mit fungalen Fructosyltransferasen die zur scFOS-Produktion genutzt werden, wurden aus diesen Gründen typischerweise Zusammensetzungen der Prozesslösungen von 50 – 60 % scFOS, 30 – 40 % Glucose, 10 - 20 % Fructose und ca. 10 % Rest-Saccharose erzielt (Nobre et al. 2022; Sánchez-Martínez et al. 2020).

Aufgrund der äußerst niedrigen Hydrolyse-Rate des InuGB-V3-Rohenzym enthielt der im 10-L-Maßstab hergestellte I-FOS-reiche Sirup nur geringfügige Mengen an Fructose (2,6 %), natürlicherweise jedoch noch relativ große Mengen Glucose (32 %) sowie nicht-reagierte Saccharose (11 %). Um die Menge der kalorienreichen Mono- und Disaccharide zu reduzieren, wurden die I-FOS mit Hilfe von Aktivkohle aufgereinigt. Hierbei wurde ein Batch-Verfahren angewendet, bei dem der hergestellte I-FOS-Sirup zunächst mit der Aktivkohle schüttelnd inkubiert wurde. Anschließend wurden die adsorbierten Saccharide durch die Zugabe von Wasser und steigenden Konzentrationen von Ethanol in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten eluiert.

### 3.6.1 Protokoll-Entwicklung

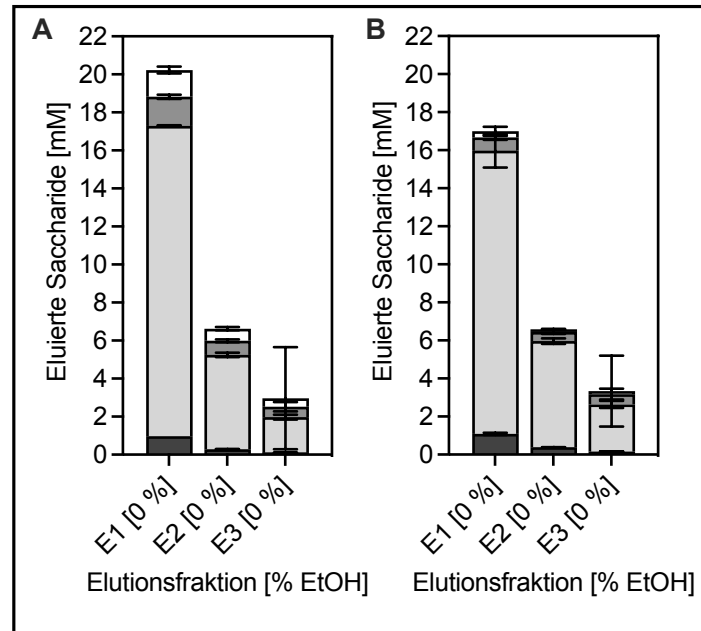
Um eine geeignete Methodik für die Aufreinigung der I-FOS zu finden, wurden verschiedene Bedingungen im 1-mL-Maßstab getestet. Zwischen den einzelnen Elutionsschritten wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation von dem jeweiligen Lösungsmittel (Elutionsfraktion) getrennt.

Zunächst wurde ein geeignetes Verhältnis von Gesamtzucker zu Aktivkohle ermittelt, bei dem die I-FOS gut von der Aktivkohle adsorbiert wurden. Bezogen auf die im I-FOS-Syntheseprozess eingesetzte Gesamtzuckermenge ( $800 \text{ g L}^{-1}$ ) wurden Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnisse von 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4,5 und 1:6 [w/w] untersucht. Nach einer Inkubation von 45 min bei  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die in Lösung verbliebenen Zucker quantifiziert. Bei einer sehr geringen Menge an Aktivkohle (1:0,5-Verhältnis) wurden die Saccharide nicht von der Aktivkohle gebunden (Abb. 24). Dahingegen adsorbierten die Saccharide mit zunehmender Aktivkohlemenge in höherem Maße an die Aktivkohle. Die Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnisse von 1:4,5 und 1:6 [w/w] erwiesen sich als geeignet, da hierbei die I-FOS nahezu vollständig an die Aktivkohle gebunden wurden (Abb. 24). Etwa 55 % der Fructose und Glucose sowie 10 % der Saccharose aus dem verwendeten I-FOS-reichen Sirup adsorbierten nicht an die Aktivkohle und verblieben im Filtrat (Abb. 24). Diese Zucker konnten daher sofort durch die Abtrennung der beladenen Aktivkohle entfernt werden (Elutionsschritt (E) 1).



**Abbildung 24. Adsorption der Saccharide an Aktivkohle bei verschiedenen Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnissen.** Dargestellt sind die adsorbierten Mengen an Fructose (■), Glucose (□), Saccharose (▣) und I-FOS (□). Zur Untersuchung der I-FOS-Adsorption wurden 100 mg Aktivkohle mit 1 mL Wasser und unterschiedlichen Volumina der Prozesslösung aus der I-FOS-Produktion (Kapitel 3.5.2) vermischt (Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnis 1:0,5 – 1:6) und für 45 min bei 40 °C und 250 rpm in einem temperaturgeregelten Schüttelinkubator inkubiert. Die Konzentrationen der in Lösung verbliebenen Saccharide wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> ermittelt. Das Experiment wurde im technischen Triplikат durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

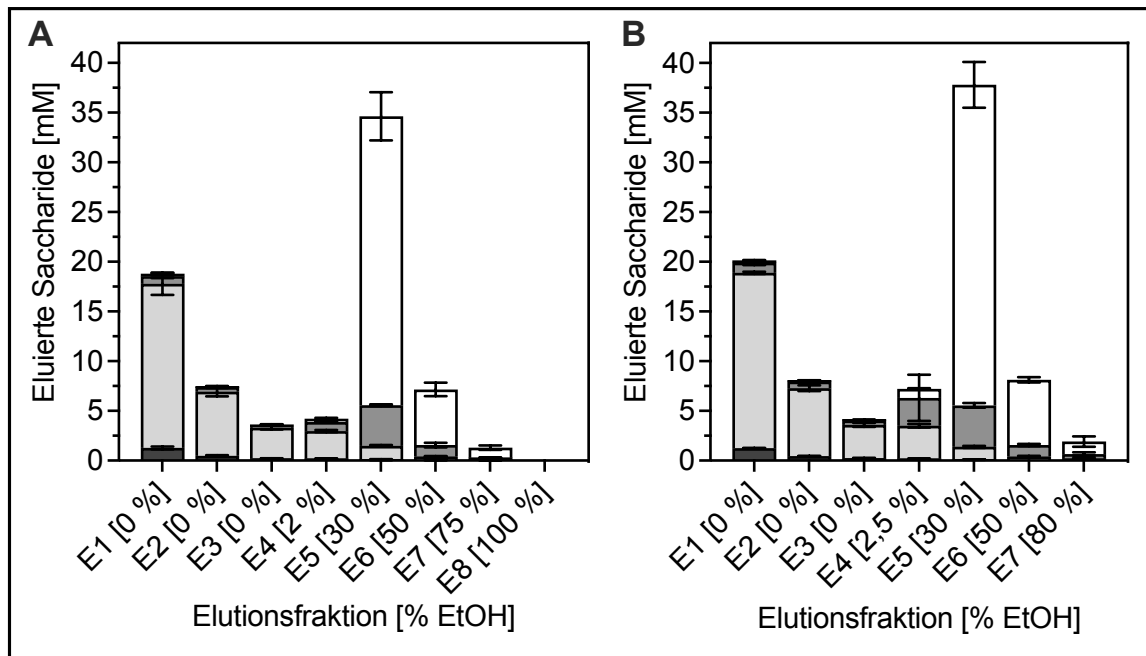
Um die verbleibende Glucose, Saccharose und Fructose zu entfernen, sollten Waschschritte durchgeführt werden. Hierfür wurde die Aktivkohle mit Wasser bzw. niedrigen Ethanol-Konzentrationen für 15 min bei 40 °C inkubiert. Erhebliche Mengen an Glucose und Fructose sowie ein Teil der Saccharose konnten mit zwei weiteren Waschschritten (E2 und E3) unter Verwendung von Wasser als Elutionsmittel entfernt werden (Abb. 25). Bei den Ansätzen mit Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnisse von 1:4,5 [w/w] gingen deutlich mehr I-FOS mit den Waschschritten verloren als mit dem 1:6-Verhältnis (Abb. 25). Aus diesem Grund wurde im Folgenden mit einem Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnis von 1:6 [w/w] weitergearbeitet.



**Abbildung 25. Auswirkung der Gesamtzucker-zu-Aktivkohle-Verhältnisse von 1:4,5 (A) und 1:6 (B) auf die Elution der Saccharide.** Dargestellt sind die eluierten Mengen an Fructose (■), Glucose (□), Saccharose (▣) und I-FOS (□) in jedem Elutionsschritt. E = Elutionsfraktion. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen in % [v/v] sind in eckigen Klammern angegeben. Zur Aufreinigung wurden 21  $\mu\text{L}$  (1:6-Verhältnis) oder 28  $\mu\text{L}$  (1:4,5-Verhältnis) Prozesslösung aus der I-FOS-Produktion (Kapitel 3.5.2) in 1 mL Wasser gegeben und mit 100 mg Aktivkohle für 45 min bei 40 °C und 250 rpm in einem temperaturgeregelten Schüttelinkubator inkubiert. Elutionsschritte wurden bei 40 °C und 250 rpm mit 1 mL Wasser durchgeführt. Details sind in Kapitel 2.10.1 zu finden. Die Saccharid-Konzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL  $\text{min}^{-1}$  ermittelt. Das Experiment wurde im technischen Triplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

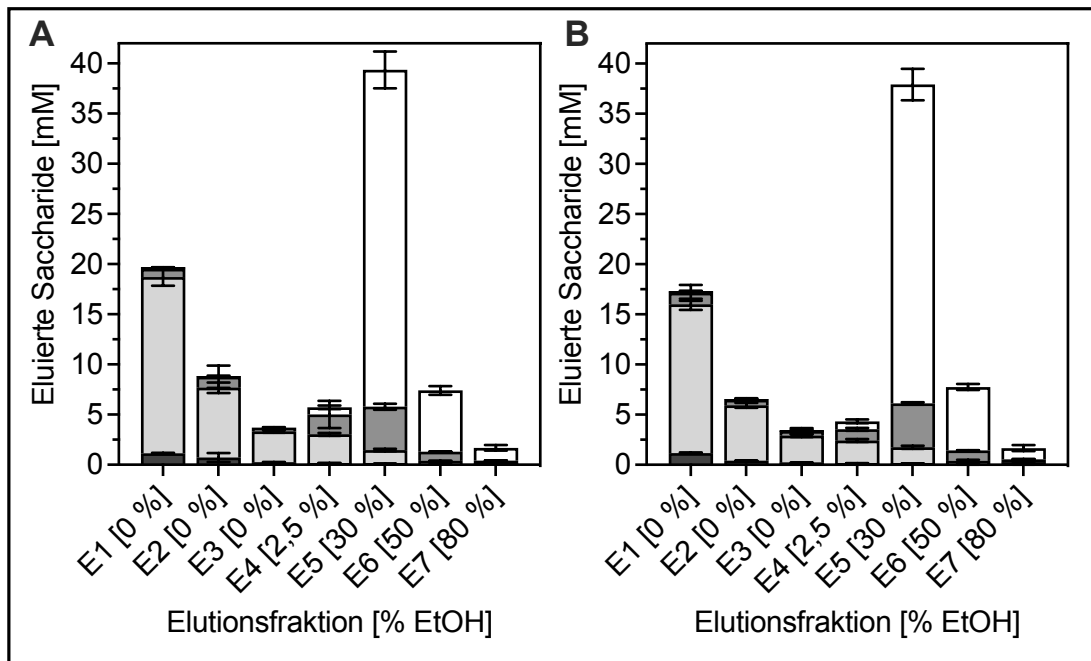
Anschließend an die drei Waschschrte mit Wasser wurde ein Elutionsschritt mit 2,5 % [v/v] Ethanol eingeführt, um den größten Teil der verbleibenden Glucose und Fructose sowie einen weiteren Teil der Saccharose zu entfernen (Abb. 26). Eine Ethanol-Konzentration von 2 % [v/v] statt 2,5 %iges Ethanol wurde ebenfalls getestet. Durch die niedrigere Ethanol-Konzentration wurde jedoch nur eine geringe Menge der Saccharose desorbiert.

Nachdem der Großteil der hochkalorischen Zucker entfernt wurde, sollten die I-FOS vollständig von der Aktivkohle eluiert werden. Zu diesem Zweck wurden Elutionsschritte mit zunehmend höheren Ethanol-Konzentrationen von 30, 50, 75, 80 und 100 % [v/v] Ethanol durchgeführt.



**Abbildung 26. Effekt von 2 oder 2,5 % Ethanol als Elutionsmittel im vierten Elutionsschritt und Auswirkung der Verlängerung der Elutionsdauer bei der Rückgewinnung der I-FOS.** Die Inkubationsdauer bei Elutionsschritt 5-7 wurde von 15 min (A) auf 20 min (B) erhöht. Dargestellt sind die eluierten Mengen an Fructose (■), Glucose (□), Saccharose (▣) und I-FOS (□) in jedem Elutionsschritt. E = Elutionsfraktion. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen in % [v/v] sind in eckigen Klammern angegeben. Zur Aufreinigung wurden 21 µL Prozesslösung aus der I-FOS-Produktion (Kapitel 3.5.2) in 1 mL Wasser gegeben und mit 100 mg Aktivkohle für 45 min bei 40 °C und 250 rpm in einem temperaturgeregelten Schüttelinkubator inkubiert. Elutionsschritte wurden bei 40 °C und 250 rpm mit 1 mL Lösungsmittel (0 – 100 % [v/v] Ethanol) durchgeführt. Details sind in Kapitel 2.10.1 zu finden. Die Saccharid-Konzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> ermittelt. Das Experiment wurde im technischen Triplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

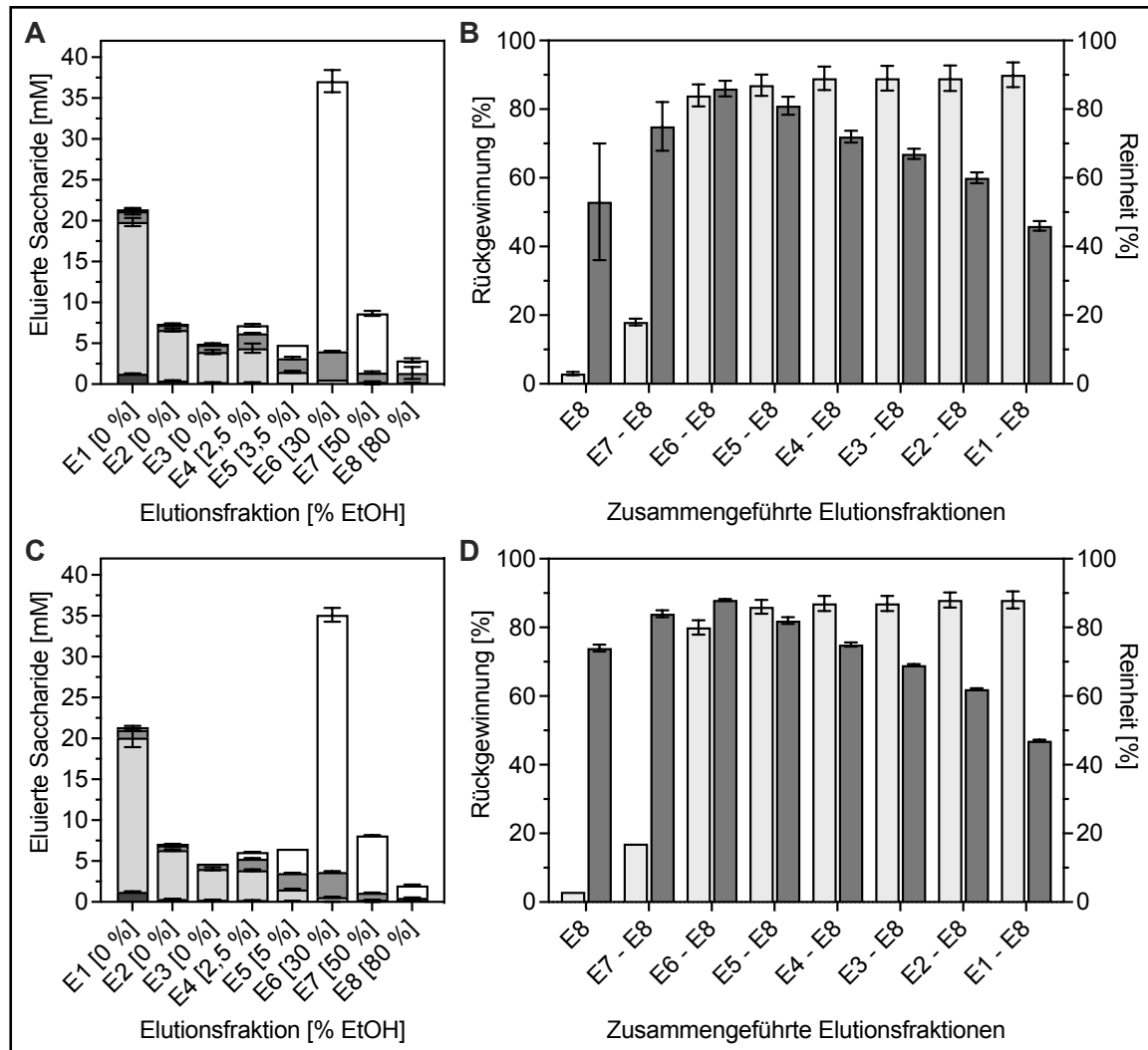
Der Elutionsschritt mit 30 % Ethanol führte zur Desorption des größten Teils der I-FOS (Abb. 26). Bei der anschließenden Elution mit 50 % und dann 75 % [v/v] Ethanol wurden abnehmende Mengen I-FOS detektiert (Abb. 26A). 79,0 ± 5,3 % der ursprünglich eingesetzten I-FOS wurden in diesen drei Elutionsschritten mit 30 – 75 % [v/v] Ethanol zurückgewonnen. Die fehlenden I-FOS konnten durch einen weiteren Elutionsschritt mit 100 % Ethanol nicht aus der Aktivkohle zurückgewonnen werden (Abb. 26A). Aus diesem Grund wurden im Folgenden die Elutionsschritte mit 75 und 100 % Ethanol durch einen Elutionsschritt mit 80 % [v/v] Ethanol ersetzt (Abb. 26B). Durch die Verlängerung der Inkubationsdauer der drei Schritte zur Elution von I-FOS (30 – 80 % [v/v] EtOH) von 15 auf 20 Minuten konnte die Rückgewinnung der I-FOS auf 85,3 ± 9,2 % verbessert werden (Abb. 26B). Die Erhöhung der Temperatur von 40 auf 50 oder 60 °C in den gleichen Elutionsschritten führte hingegen zu keiner weiteren Verbesserung der I-FOS-Elution (Abb. 27).



**Abbildung 27. Erhöhung der Inkubationstemperatur zur Elution von I-FOS.** Die Inkubationstemperatur bei Elutionsschritt 5-7 wurde auf 50 °C (A) bzw. 60 °C (B) erhöht. Dargestellt sind die eluierten Mengen an Fructose (■), Glucose (□), Saccharose (▒) und I-FOS (□) in jedem Elutionsschritt. E = Elutionsfraktion. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen in % [v/v] sind in eckigen Klammern angegeben. Zur Aufreinigung wurden 21 µL Prozesslösung aus der I-FOS-Produktion (Kapitel 3.5.2) in 1 mL Wasser gegeben und mit 100 mg Aktivkohle für 45 min bei 40 °C und 250 rpm in einem temperaturgeregelten Schüttelinkubator inkubiert. Elutionsschritte wurden mit 1 mL Lösungsmittel (0 – 80 % [v/v] Ethanol) mit 250 rpm bei 40 °C für 15 min (E1-E4) bzw. 50 °C oder 60 °C für 20 min (E5-E7) durchgeführt. Details sind in Kapitel 2.10.1 zu finden. Die Saccharid-Konzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> ermittelt. Das Experiment wurde im technischen Triplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Um die Reinheit der I-FOS weiter zu erhöhen, wurde nach dem Elutionsschritt mit 2,5 % [v/v] Ethanol ein zusätzlicher Waschschriff mit 3,5 bzw. 5 % [v/v] Ethanol durchgeführt (Abb. 28).

Mit 5 % Ethanol konnte in diesem Schritt mehr Saccharose eluiert werden als mit 3,5 % Ethanol (Abb. 28A, C). Dies zeigte, dass die verbleibende Saccharose bei höheren Ethanol-Konzentrationen effektiv eluiert wurde. Allerdings führten höhere Ethanol-Konzentrationen gleichzeitig zu einer unerwünschten Elution der gebundenem I-FOS (Abb 28C), sodass die I-FOS-Rückgewinnung in den nachfolgenden Elutionsschritten (30 – 80 % [v/v] EtOH) nur  $79,8 \pm 2,1$  % betrug (Abb 28D). Dahingegen wurde die I-FOS-Reinheit mit Hilfe des Waschschriffes mit 3,5 % EtOH von  $83,2 \pm 0,7$  % auf  $85,6 \pm 2,3$  % erhöht, während die I-FOS-Rückgewinnung nur geringfügig verringert wurde (auf  $83,5 \pm 3,2$  %, Abb 28A, B). Um einen größeren Verlust an I-FOS zu vermeiden, wurde auf eine stärkere Elution der Saccharose verzichtet.



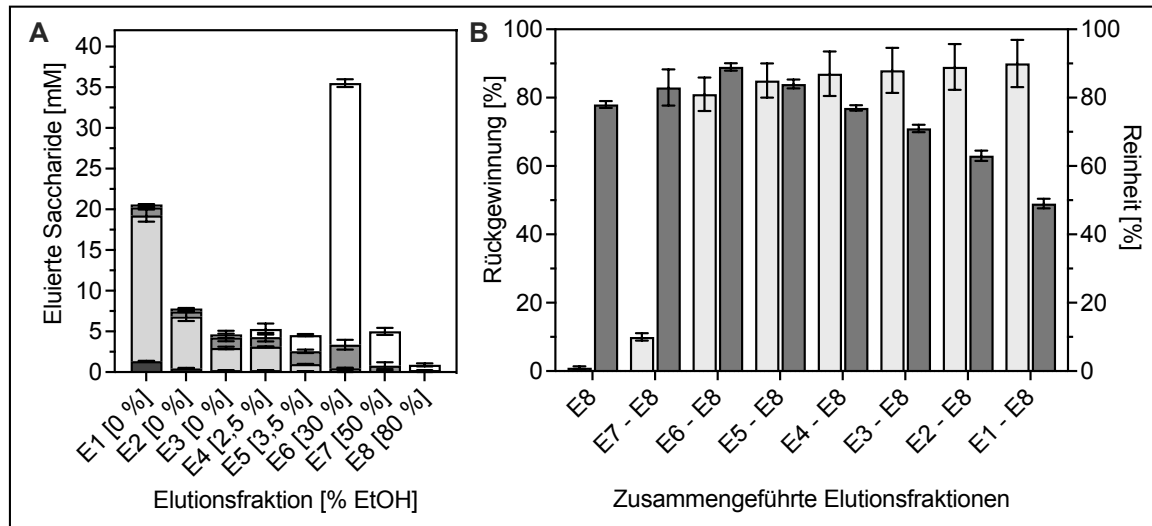
**Abbildung 28. Auswirkung eines zusätzlichen Waschschrtes (E5) mit 3,5 (A, B) oder 5 % [v/v] Ethanol (C, D) auf die I-FOS-Aufreinigung.** Dargestellt sind die eluierten Mengen an Fructose (■), Glucose (□), Saccharose (■) und I-FOS (□) in jedem Elutionsschritt (A, C) bzw. die I-FOS-Rückgewinnung (□) und -Reinheit (■) in zusammengeführten Elutionsfraktionen (B, D). E = Elutionsfraktion. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen in % [v/v] sind in eckigen Klammern angegeben. Zur Aufreinigung wurden 21  $\mu$ L Prozesslösung aus der I-FOS-Produktion (Kapitel 3.5.2) in 1 mL Wasser gegeben und mit 100 mg Aktivkohle für 45 min bei 40 °C und 250 rpm in einem temperaturgeregelten Schüttelinkubator inkubiert. Elutionsschritte wurden bei 40 °C und 250 rpm mit 1 mL Lösungsmittel (0 – 80 % [v/v] Ethanol) durchgeführt. Details sind in Kapitel 2.10.1 zu finden. Die Saccharid-Konzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> ermittelt. Das Experiment wurde im technischen Triplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Zusammenfassend bestand das optimale Protokoll für die Aufreinigung der I-FOS aus acht Elutionsschritten mit E1 = 0 %, E2 = 0 %, E3 = 0 %, E4 = 2,5 %, E5 = 3,5 %, E6 = 30 %, E7 = 50 %, E8 = 80 % [v/v] Ethanol als Elutionsmittel. Mit diesem Protokoll konnten 84 % [w/w] der I-FOS mit einer Reinheit von 86 % zurückgewonnen werden.



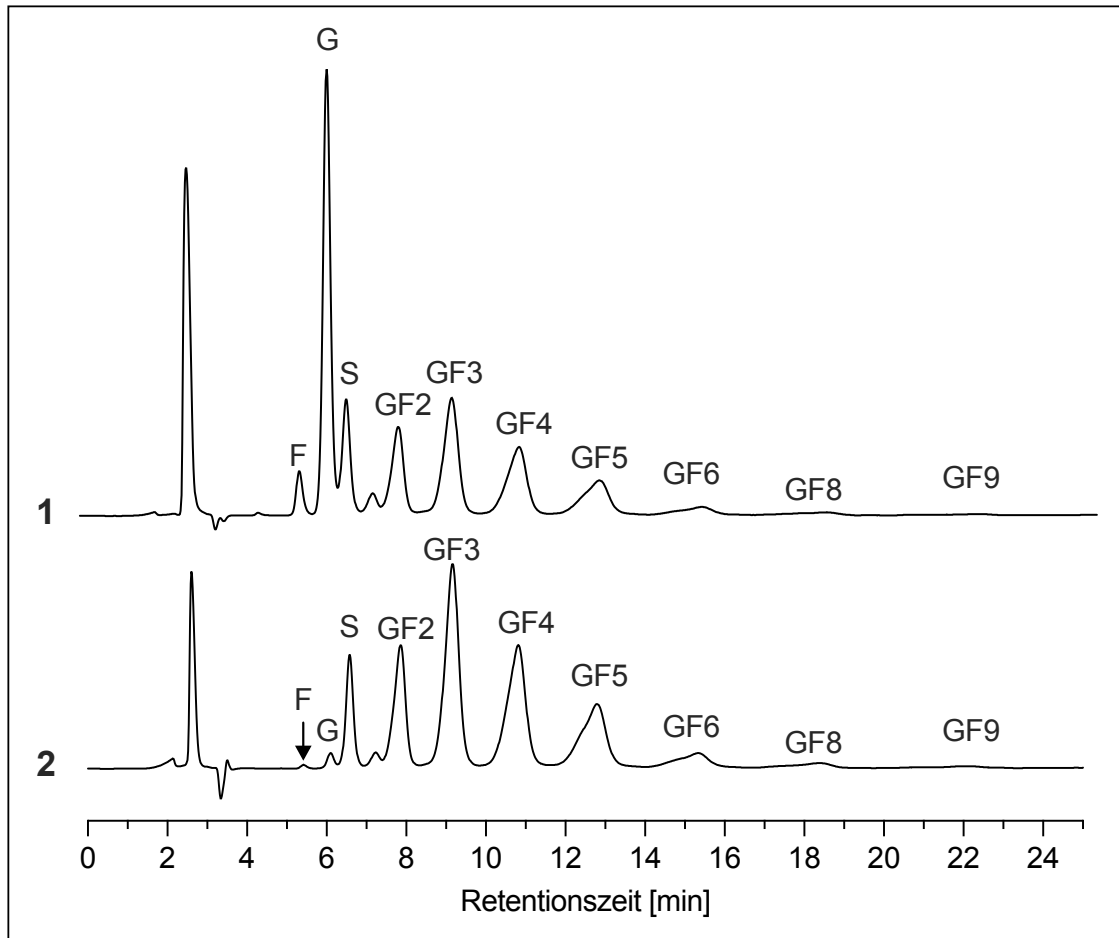
### 3.6.2 Upscaling des Aufreinigungs-Prozesses auf einen 1-L-Maßstab

Das entwickelte Protokoll wurde auf ein Lösungsmittelvolumen von 1 L, 100 g Aktivkohle und 21 mL I-FOS-reicher Prozesslösung hochskaliert. Zwischen den Elutionsschritten wurde die Aktivkohle mit Hilfe von Vakuumfiltration von dem jeweiligen Lösungsmittel getrennt.



**Abbildung 29. Upscaling des finalen Aufreinigungsprotokolls auf einen 1-L-Maßstab. (A)** Eluierte Mengen an Fructose (■), Glucose (□), Saccharose (▣) und I-FOS (□) in jedem Elutionsschritt, angegeben in den Stoffmengen der enthaltenen Monosaccharid-Konzentrationen. E = Elutionsfraktion. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen in % [v/v] sind in eckigen Klammern angegeben. **(B)** I-FOS-Rückgewinnung (□) und -Reinheit (■) in zusammengeführten Elutionsfraktionen. Zur Aufreinigung wurden 21 mL Prozesslösung aus der I-FOS-Produktion (Kapitel 3.5.2) in 1 L Wasser gegeben und mit 100 g Aktivkohle für 45 min bei 40 °C und 250 rpm in einem temperaturgeregelten Schüttelinkubator inkubiert. Elutionsschritte wurden bei 40 °C und 250 rpm mit 1 L Lösungsmittel (0 – 80 % [v/v] Ethanol) durchgeführt. Details sind in Kapitel 2.10.2 zu finden. Die Saccharid-Konzentrationen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> ermittelt. Das Experiment wurde im technischen Triplikate durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Das hochskalierte Verfahren lieferte nahezu identische Ergebnisse zu der Aufreinigung im kleinen Maßstab (Abb. 28A/B und 29). So wurden in den fünf Waschschrritten mit 0 – 3,5 % [v/v] Ethanol 96,9 % der Fructose, 98,1 % der Glucose und 59,7 % der Saccharose entfernt (Abb. 29). Nur 8,8 % der ursprünglich aufgetragenen Menge an I-FOS ging in diesen Waschschrritten verloren. In den letzten drei, zusammengeführten Elutionsfraktionen mit 30 – 80 % [v/v] Ethanol wurden 80,8 ± 4,9 % der ursprünglich eingesetzten I-FOS mit einer Reinheit von 89,2 ± 1,1 % [w/w] wiedergewonnen (Abb. 29B). Die Verunreinigungen bestanden hauptsächlich aus Saccharose mit 9,2 ± 1,1 % und Spuren von Glucose (1,4 ± 0,2 %) und Fructose (0,2 ± 0,2 %). Somit konnte die Reinheit der I-FOS von 53 % auf etwa 90 % [w/w] erhöht werden.



**Abbildung 30. Vergleich der Chromatogramme der aufgereinigten I-FOS und der in der Aufreinigung eingesetzten I-FOS-Prozesslösung.** 1: I-FOS-Prozesslösung aus der Produktion im 10-L-Maßstab. 2: Lyophilisierte, aufgereinigte I-FOS mit 89 %iger Reinheit. F: Fructose. G: Glucose. S: Saccharose. GF2-GF9: I-FOS mit steigendem DP von 3-10. Die Auftrennung der Saccharide erfolgte mittels isokratischer HPLC unter Verwendung von Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 58 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ .

Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurde Ethanol und Teile des Wassers aus den drei letzten, zusammengeführten Elutionsfraktionen entfernt, sodass das Volumen um das zwanzigfache reduziert wurde. Anschließend wurden die aufkonzentrierten I-FOS lyophilisiert und gemörst. Auf diese Weise wurden  $348,6 \pm 4,8 \text{ g}$  aufgereinigte I-FOS in Pulverform pro Liter eingesetzter Prozesslösung gewonnen. Abschließend wurden die lyophilisierten I-FOS in Wasser gelöst und ein Aliquot mittels HPLC analysiert. Auf diese Weise wurde bestätigt, dass sowohl die Fructose als auch die Glucose fast vollständig entfernt wurde und die Saccharose-Konzentration stark reduziert worden war (Abb. 30).

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zur I-FOS-Synthese entwickelt, mit dem mittels einer bakteriellen Inulosucrase hohe Mengen an I-FOS auf effiziente Weise hergestellt werden konnten. Zudem wurden die Glucose und Fructose mit dem präsentierten Aufreinigungs-Protokoll fast vollständig aus der Prozesslösung entfernt. Der entwickelte I-FOS-

Produktionsprozess birgt somit das Potential, im großtechnischen Maßstab angewendet zu werden

### **3.7 Wachstum von bakteriellen Vertretern der menschlichen Darmmikrobiota auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs**

Die Modulation der Darmmikrobiota durch die Einnahme von Präbiotika ist ein vielversprechender Ansatz zur Förderung der Darmgesundheit und zur Therapie-Ergänzung von verschiedenen Krankheitsbildern und Beschwerden (Fan und Pedersen 2021). Die selektive Stimulation des Wachstums von gesundheitsförderlichen Bakterien, insbesondere Bifidobakterien und Laktobazillen, durch Inulin, pflanzenbasierten I-FOS und scFOS, wurde in vielen Studien belegt (Fu et al. 2022; Ramirez-Farias et al. 2008; Roberfroid et al. 1998). Auch Levan und L-FOS haben das Potential in Zukunft als Präbiotikum genutzt werden zu können. Mehrere probiotische *Bifidobacterium*- und *Lactobacillus*-Stämme sowie die probiotische Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten Levan und L-FOS in Wachstumsexperimenten als Substrat nutzen (Pohlentz et al. 2022). Außerdem wurde das Wachstum von Bifidobakterien in Fermentern, die mit menschlichen Fäkalien inokuliert worden waren, durch Levan selektiv stimuliert (Liu et al. 2020). Allerdings wurde ebenfalls beobachtet, dass neben *Bifidobacterium*- und *Lactobacillus*-Bakterien zahlreiche weitere kommensale Darmbakterien Fructane zum Wachstum nutzen können, wie beispielsweise *Bacteroides*- und *Roseburia*-Spezies (Adamberg et al. 2015; Mao et al. 2015; Scott et al. 2014). Auch einige Darmbakterien die als gesundheitsschädigend gelten, da sie mit Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, nutzten Fructane zum Wachstum (Mao et al. 2015; Wang et al. 2020). Die Reduzierung des Verzehrs von Fructan-reichen Lebensmitteln konnte zudem zu einer Besserung der Symptome bei Patienten mit Reizdarmsyndrom führen (Harvie et al. 2017). Zusammenfassend haben Fructane das Potential unterschiedliche Effekte hervorzurufen (Scott et al. 2014). Deshalb ist ein tiefergehendes Verständnis zur Wirkungsweise von Fructanen nötig, um diese gezielt und mit dem gewünschten Resultat als Präbiotikum einsetzen zu können. Als Grundlage hierzu müssen die Bakterienspezies identifiziert werden, die die unterschiedlichen Fructane metabolisieren können. Hierbei sollte auch analysiert werden, wie ausgeprägt das Wachstum auf den unterschiedlichen Fructanen erfolgt (Mao et al. 2015). Insbesondere zu den potenziellen Präbiotika Levan und L-FOS bedarf es weiterer Untersuchungen.

Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das Wachstum einiger wichtiger bakterieller Vertreter der menschlichen Darmmikrobiota auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs als Substrat untersucht. Die Produktion und Aufreinigung der I-FOS in dieser Arbeit eröffnete die Möglichkeit, im Rahmen der Wachstumsversuche erstmals die Verstoffwechslung von bakteriellen I-FOS durch Darmbakterien zu untersuchen. Somit war es von besonderem Interesse, wie gut die bakteriellen I-FOS im Vergleich zu den anderen Fructanen zum Wachstum genutzt werden konnten.

Die (bakterielle) Darmmikrobiota gesunder Menschen wird von Bakterien der Phyla Bacillota und Bacteroidota dominiert (King et al. 2019). Zusammengenommen können die Bacillota- und Bacteroidota-Bakterien 90 % der Bakterien ausmachen (Arumugam et al. 2011). Weitere häufig vertretene Bakterien-Phyla sind Actinomycetota und Verrucomicrobiota (Eckburg et al. 2005). Für die Wachstumsversuche wurden kommensale Darmbakterien ausgewählt, die häufig und teilweise in sehr großer Anzahl in der Darmmikrobiota von gesunden Menschen nachgewiesen werden. So wurden die Bakterien *Bacteroides intestinalis* DSM 17393 (*B. intestinalis*), *Bacteroides xylanisolvens* DSM 18836 (*B. xylanisolvens*), *Parabacteroides johnsonii* DSM 18315 (*P. johnsonii*), *Phocaeicola vulgatus* DSM 1447 (*P. vulgatus*) und *Segatella copri* DSM 18205 (*S. copri*) des Phylums Bacteroidota kultiviert. Des Weiteren wurde das Wachstum der dem Phylum Bacillota zugehörigen Bakterien *Agathobacter rectalis* DSM 17629 (*A. rectalis*), *Clostridium leptum* DSM 753 (*C. leptum*), *Dorea formicigenerans* DSM 3992 (*D. formicigenerans*), *Faecalibacterium duncaniae* DSM 17677 (*F. duncaniae*) und *Ruminococcus gnavus* DSM 108212 (*R. gnavus*), sowie des Actinomycetota-Bakteriums *Collinsella intestinalis* DSM 13280 (*C. intestinalis*) auf den Fructanen analysiert.

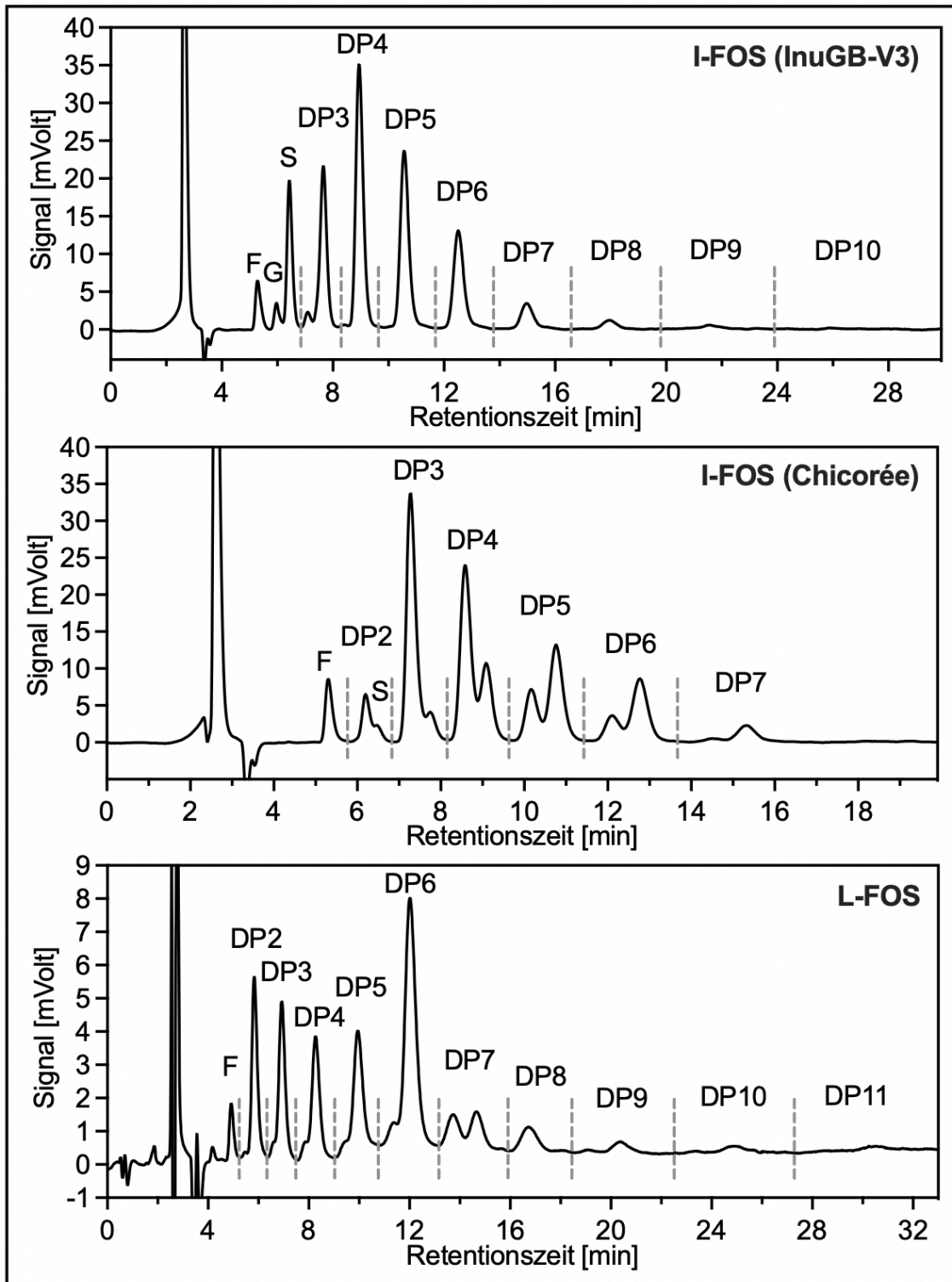
Als Substrat kamen die Fructan-Polymere Inulin und Levan zum Einsatz. Das verwendete Inulin stammte aus Chicorée und wurde kommerziell bezogen (Megazyme Inc.). Das Levan wurde wie in Pohlentz et al. (2022) beschrieben mit der Levansucrase aus *Gluconobacter japonicus* LMG 1417 synthetisiert und aufgereinigt (zur Verfügung gestellt von Dr. Marcel Hövels, Universität Bonn). Des Weiteren wurde das Wachstum der Bakterien auf drei FOS-Substraten analysiert. So wurden die in dieser Arbeit mit InuGB-V3-Rohenzym hergestellten und aufgereinigten I-FOS, aus Chicorée-Inulin gewonnene I-FOS (Megazyme Inc.), sowie L-FOS eingesetzt, welche mit der *endo*-Levanase aus *Acetobacter chroococcum* DSM 2286 durch die Hydrolyse des Levans hergestellt wurden (zur Verfügung gestellt von Joana Pohlentz, Pohlentz et al. 2022).

### 3.7.1 Analyse der eingesetzten Fructane

Bevor die oben genannten Fructane als Substrat in Wachstumsversuchen eingesetzt werden konnten, wurden sie auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Zum einen wurden die Substrate hierzu mittels HPLC analysiert. Auf diese Weise wurden die Struktur und Komposition der FOS, sowie Verunreinigungen aller Substrate mit den kalorienreichen Zuckern Fructose, Glucose und Saccharose bestimmt. Darüber hinaus wurden die Fructane enzymatisch zu Fructose und Glucose hydrolysiert (mit Fructanase-Mix, Megazyme Inc., Bray, Irland) um den Glucosegehalt der Fructane zu ermitteln.

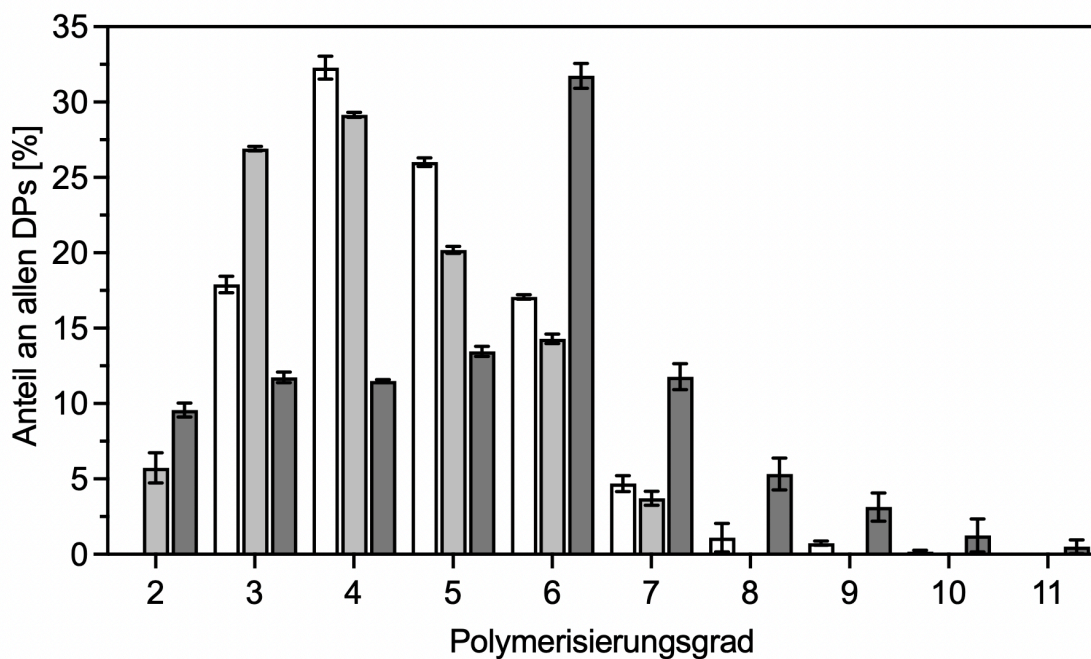
Bereits in Kapitel 3.5.2 und 3.6.2 wurde die Analyse der in dieser Arbeit hergestellten I-FOS (InuGB-V3) mittels HPLC ausführlich beschrieben. Die erneute HPLC-Analyse des Substrates bestätigte, dass die I-FOS (InuGB-V3) eine sehr homogene Komposition aus I-FOS des GFn-Typs mit einem DP von 3-10 aufwies (Abb. 31). Insgesamt überwogen die kurzkettigen I-FOS mit einem DP von 3-6 (93 % aller I-FOS), wobei das I-FOS mit einem DP4 das Hauptprodukt darstellte (32 % aller I-FOS) (Abb. 31, 32).

I-FOS (Chicorée) werden durch die enzymatische Hydrolyse von Inulin, welches aus Chicorée extrahiert wird, hergestellt (Herstellerangaben, Megazyme Inc.). Dementsprechend bestehen die I-FOS (Chicorée) aus einer Mischung aus I-FOS des Fn- und des GFn-Typs. Die HPLC-Analyse zeigte, dass die I-FOS des Fn-Typs überwogen, jedoch auch große Mengen GFn-FOS enthalten waren (Abb. 31). Die I-FOS hatten DPs von 2-7, wobei die meisten Monomer-Einheiten in den I-FOS mit DP 3-4 zu finden waren (56 %) (Abb. 31, 32). Es waren jedoch auch maßgebliche Mengen an I-FOS mit DP5 und 6 vorhanden (35 %). Somit ähnelten sich die beiden I-FOS-Substrate in der Verteilung der DPs. In der Heterogenität ihrer Struktur unterschieden sich die I-FOS-Substrate jedoch.



**Abb. 31.** Chromatographische Analyse der in den Wachstumsversuchen eingesetzten FOS. I-FOS (InuGB-V3): In dieser Arbeit mit InuGB-V3-Rohenzym synthetisierte und aufgereinigte I-FOS (Kapitel 3.5.2 und 3.6.2). I-FOS (Chicorée): Bezogen von Megazyme Inc. L-FOS: Enzymatisch synthetisiert (Pohlentz et al. 2022, Details s. Kapitel 3.7) (---): Abgrenzung der DPs der FOS. F: Fructose. G: Glucose. S: Saccharose. Die FOS wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 60 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  aufgetrennt.

Die HPLC-Analyse der L-FOS zeigte, dass es sich um eine Mischung aus DP2-11 handelte, wobei das L-FOS mit DP6 das Hauptprodukt bildete (32 %) (Abb. 31, 32). Die L-FOS mit DP2, 3, 4, 5 und 7 waren in etwa gleichen Anteilen von 12-14 % enthalten, die L-FOS mit höherem Molekulargewicht in abnehmender Menge (insg. 10 %). Damit waren im Vergleich zu den eingesetzten I-FOS größere Mengen der Monomer-Einheiten in langkettigen FOS gebunden. Darüber hinaus zeigte die HPLC-Analyse, dass die L-FOS hauptsächlich aus L-FOS des Fn-Typs bestanden, L-FOS des GFn-Typs waren nur in Spuren vorhanden (Abb. 31).



**Abb. 32. Verteilung der Monomer-Einheiten auf die verschiedenen DPs der in Wachstumsversuchen eingesetzten FOS.** Die Konzentration der Fructose- und Glucose-Monomere in den FOS-Substraten I-FOS (InuGB-V3) (□), I-FOS (Chicorée) (▣) und L-FOS (■) wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 60 % [v/v] Acetonitril bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> bestimmt.

Dies wurde durch die enzymatische Hydrolyse der L-FOS bestätigt, die offenbarte, dass die L-FOS lediglich einen Glucosegehalt von 1,8 % aufwiesen (Tabelle 23). Während in Levan, Inulin und den I-FOS (Chicorée) etwas mehr Glucose enthalten war (4,1 – 7,5 %, Tabelle 23), wiesen die mit InuGB-V3-Rohenzym hergestellten I-FOS mit Abstand den höchsten Glucosegehalt auf (26 %). Hiervon stammten nur ca. 4,5 % aus den Verunreinigungen des Substrates mit Glucose und Saccharose. Vielmehr war der hohe Glucosegehalt auf das Vorhandensein von I-FOS des GFn-Typs, das Fehlen von I-FOS des Fn-Typs und die große Menge an kurz-kettigen I-FOS zurückzuführen.

**Tabelle 23: Fructose- und Glucosegehalt der als Substrat in Wachstumsexperimenten eingesetzten Fructane.<sup>a)</sup>**

Substrat	Monomere insg. [mM] <sup>f)</sup>	Glucosegehalt [%]	Fructosegehalt [%]
I-FOS (InuGB-V3) <sup>b)</sup>	420,5 ± 12,2	25,8 ± 0,7	74,2 ± 0,7
I-FOS (Chicorée) <sup>c)</sup>	411,0 ± 9,6	7,5 ± 1,0	92,5 ± 1,0
Inulin <sup>d)</sup>	389,3 ± 23,8	4,1 ± 1,2	95,9 ± 1,2
L-FOS <sup>e)</sup>	405,8 ± 39,4	1,8 ± 0,8	98,2 ± 0,8
Levan <sup>e)</sup>	408,7 ± 67,4	5,3 ± 0,7	94,7 ± 0,7

<sup>a)</sup>Zur Analyse der Fructane wurden die in den Wachstumsexperimenten eingesetzten 400 mM Stocklösungen zur enzymatischen Hydrolyse in Assays mit Fructanase-Mix (Megazyme) eingesetzt. Die Konzentration der aus den Fructanen freigesetzten Fructose und Glucose wurde mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 60 % AcN als Laufmittel bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> bestimmt. Die Hydrolyse-Assays wurden im technischen Triplikate durchgeführt.

<sup>b)</sup>In dieser Arbeit mit InuGB-V3-Rohenzym hergestellte und aufgereinigte I-FOS.

<sup>c)</sup>Aus Chicorée (Megazyme, Inc.)

<sup>d)</sup>Aus Chicorée (Megazyme, Inc.)

<sup>e)</sup>Bakteriell, wie in Pohlentz et al. 2022 beschrieben hergestellt (Details s. Kapitel 3.7)

<sup>f)</sup>Summe der aus den Fructanen freigesetzten Glucose- und Fructosemonomeren

Alle Fructane wiesen leichte Verunreinigungen mit Fructose, Glucose oder Saccharose auf (Tabelle 24). Mit Ausnahme der pflanzenbasierten I-FOS, die 4,3 % Fructose enthielten, war die Verunreinigung der Substrate mit Fructose und Glucose eher gering (0,2 – 2,3 %). Wie bei der Aufreinigung mit Aktivkohle beobachtet, enthielten die produzierten I-FOS (InuGB-V3) im Gegensatz zu den anderen Substraten noch recht hohe Mengen Saccharose (10 %). Die Reinheit der Fructane reichte aufgrund der Verunreinigungen von 86 % (I-FOS InuGB-V3) bis 99 % (Inulin).

**Tabelle 24: Reinheit der als Substrat in Wachstumsexperimenten eingesetzten Fructane.**

Substrat	Verunreinigende Substanz <sup>a)</sup>			Reinheit [%]
	Fructose [%]	Glucose [%]	Saccharose [%]	
I-FOS (InuGB-V3) <sup>b)</sup>	2,2 ± 1,0	1,8 ± 0,4	10,0 ± 0,5	85,9 ± 2,0
I-FOS (Chicorée) <sup>c)</sup>	4,3 ± 1,0	0	1,4 ± 0,5	94,4 ± 1,4
Inulin <sup>d)</sup>	0,8 ± 0,6	0	0,1 ± 0,1	99,0 ± 0,7
L-FOS <sup>e)</sup>	2,3 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0	97,5 ± 0,4
Levan <sup>e)</sup>	1,4 ± 0,3	2,1 ± 0,5	0,1 ± 0,04	96,4 ± 0,2

<sup>a)</sup>Die Konzentrationen an Fructose, Glucose und Saccharose in den Fructanen wurden mittels isokratischer HPLC unter Verwendung der Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E mit 60 % AcN als Laufmittel bei einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> bestimmt. Hochmolekulares Inulin und Levan wurde zuvor mit Hilfe des fünffachen Volumens an Ethanol präzipitiert, sodass nur kurzkettige Saccharide analysiert wurden. Die Berechnungen basieren auf den insgesamt in den Substraten enthaltenen Monomer-Einheiten (Tabelle 23).

<sup>b)</sup>In dieser Arbeit mit inuGB-V3-Rohenzym hergestellte und aufgereinigte I-FOS.

<sup>c)</sup>Aus Chicorée (Megazyme, Inc.)

<sup>d)</sup>Aus Chicorée (Megazyme, Inc.)

<sup>e)</sup>Bakteriell, wie in Pohlentz et al. 2022 beschrieben hergestellt (Details s. Kapitel 3.7)



### 3.7.2 Wachstumsversuche mit menschlichen Darmbakterien

Nach der Analyse der Fructane des Inulin- und Levan-Typs wurden diese als Kohlenstoffquelle in Wachstumsversuchen mit einigen wichtigen Darmbakterien eingesetzt. Zum einen sollte dadurch untersucht werden, inwieweit die Fähigkeit zur Verstoffwechslung der unterschiedlichen Fructane in den kommensalen Darmbakterien vertreten ist. Des Weiteren sollte analysiert werden, wie gut die bakteriellen I-FOS im Vergleich zu den anderen Fructanen metabolisiert werden können.

Um eine kontinuierliche Messung der Zelldichte und einen hohen Durchsatz an Wachstumsversuchen zu ermöglichen, erfolgte die Kultivierung der Darmbakterien in Mikrotiterplatten (48-well-Format) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät unter anoxischen Bedingungen. Da bei hohen Zelldichten eine Verfälschung der OD aufgrund von mehrfacher Lichtstreuung nicht vermieden werden konnte, wurden zunächst für jeden Bakterienstamm Kalibrierkurven erstellt. Mit deren Hilfe konnten die vom Mikrotiterplatten-Lesegerät erfassten OD's auf Werte normalisiert werden, die Messungen von verdünnten Zellsuspensionen in einem Photometer entsprachen (s. 2.4.4 Material und Methoden, Abb. 3).

#### 3.7.2.1 Wachstum der Darmbakterien auf Glucose, Fructose und Maltose

Mit Ausnahme von *C. leptum* wuchsen alle Bakterien auf den mit Glucose und Fructose supplementierten Medien (Abb. 33, 34, 35). Hierbei zeigte sich, dass bei *F. duncaniae*, *S. copri*, *B. xylanisolvens* und *B. intestinalis* das Wachstum auf diesen Substraten mit ähnlicher Geschwindigkeit und Stärke erfolgte, wobei max. Zelldichten von  $OD = 1,1 \pm 0,1 - 3,1 \pm 0,3$  erreicht wurden.

*P. johnsonii*, *R. gnavus* und *A. rectalis* zeigten hingegen eine bessere Verstoffwechslung von Glucose gegenüber Fructose. Dennoch war nicht nur eine kürzere lag-Phase zu beobachten (*P. johnsonii* und *R. gnavus*), sondern auch eine höhere Wachstumsrate (*P. johnsonii*, *R. gnavus*). Die Kulturen von *A. rectalis* und *R. gnavus* erreichten mit max. ODs von  $3,2 \pm 0,1$  bzw.  $3,3 \pm 0,1$  darüber hinaus höhere Zelldichten im Vergleich mit Fructose als Substrat (max. ODs =  $2,4 \pm 1,1$  bzw.  $2,7 \pm 0,1$ ).

Im Gegensatz dazu konnten *D. formicigenerans* und *P. vulgatus* Fructose besser verstoffwechseln als Glucose. So führte die Kultivierung von *D. formicigenerans* mit Fructose zu einer deutlich schnelleren Wachstumsgeschwindigkeit sowie einer geringfügig verkürzten lag-Phase und erhöhten Biomasse-Ausbeute ( $OD = 3,5 \pm 0,1$  bzw.  $3,1 \pm 0,03$ ) als mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Das Wachstum von *P. vulgatus* auf Glucose erfolgte in zwei Phasen, wobei die erste Wachstumsphase (0-18 h Inkubation) eine geringere Wachstumsrate aufwies als die zweite

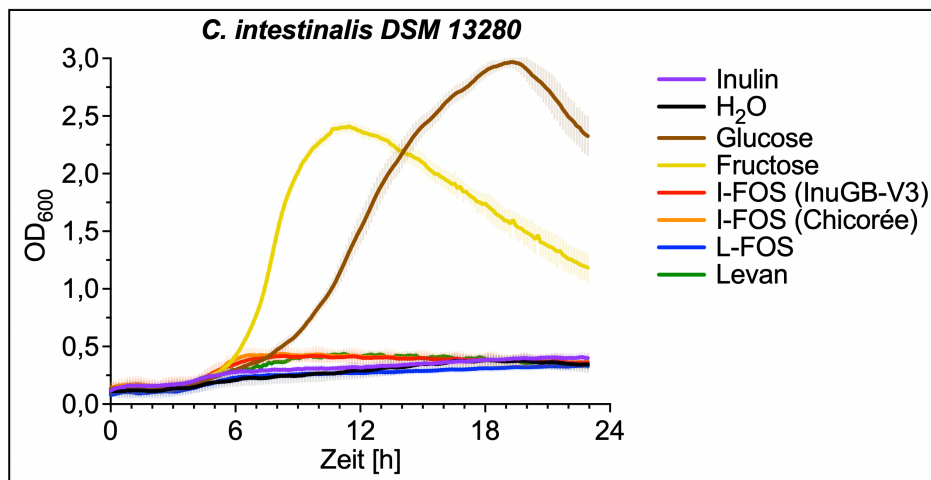
Wachstumsphase (18-32 h Inkubation), die der Wachstumsgeschwindigkeit von *P. vulgatus* auf Fructose ähnelte.

Die Kultivierung von *C. intestinalis* erfolgte sowohl auf der Glucose- als auch der Fructose-Kontrolle. Hierbei konnte bei Wachstum auf Fructose eine kürzere lag-Phase und eine schnellere Zunahme der Zelldichte beobachtet werden. Allerdings wurde dennoch mit Glucose eine höhere OD ( $3,0 \pm 0,05$ ) als mit Fructose ( $2,4 \pm 0,04$ ) erzielt.

Sowohl Glucose als auch Fructose wurden nicht von *C. leptum* metabolisiert. Jedoch wurde für dieses Bakterium eine zusätzliche Kontrolle mit Maltose durchgeführt. Auf diesem Substrat zeigte *C. leptum* Wachstum mit Biomasse-Ausbeuten von max. OD =  $1,1 \pm 0,08$ .

### 3.7.2.2 Wachstum von *C. intestinalis* auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

Das Actinomycetota-Bakterium *C. intestinalis* konnte keines der supplementierten Fructane als Substrat zum Wachstum nutzen. Dementsprechend war nur in den Glucose- und Fructose-Kontrollen ein Anstieg der Zelldichte zu beobachten (Abb. 33).



**Abbildung 33. Wachstum von *C. intestinalis* DSM 13280 auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs.** Die Kultivierung erfolgte im Triplikate in 48-well-Mikrotiterplatten in einem Mikroplatten-Lesegerät unter N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. In einem finalen Volumen von 600 µL wurde TPYM-Medium mit 100 mM Bis-Tris-Puffer und 30 mM Kohlenstoffquelle (bezogen auf die enthaltenen Monomer-Einheiten) vermischt. Es wurde das Wachstum auf Glucose, Fructose, den in dieser Arbeit hergestellten I-FOS (I-FOS InuGB-V3), aus Chicorée-Inulin hergestellten I-FOS (I-FOS Chicorée, Megazyme Inc.), Inulin aus Chicorée (Megazyme Inc.), bakteriellem Levan (Pohlentz et al. 2022) oder L-FOS, welche durch Hydrolyse des verwendeten Levans hergestellt wurden (Pohlentz et al. 2022), untersucht. Der H<sub>2</sub>O-Kontrolle wurde keine Kohlenstoffquelle zugegeben. Nach Inokulation mit 3,4 % [v/v] Vorkultur erfolgte die Kultivierung bei 37 °C. Die Absorption bei 600 nm wurde alle 8 min gemessen. Verwendete Medien und der pH-Wert des Puffers sind Kapitel 2.4.4, Tabelle 14 zu entnehmen, verwendete Medien-Zusätze sind in Kapitel 2.4.3. zu finden.

### 3.7.2.3 Wachstum der Bacteroidota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

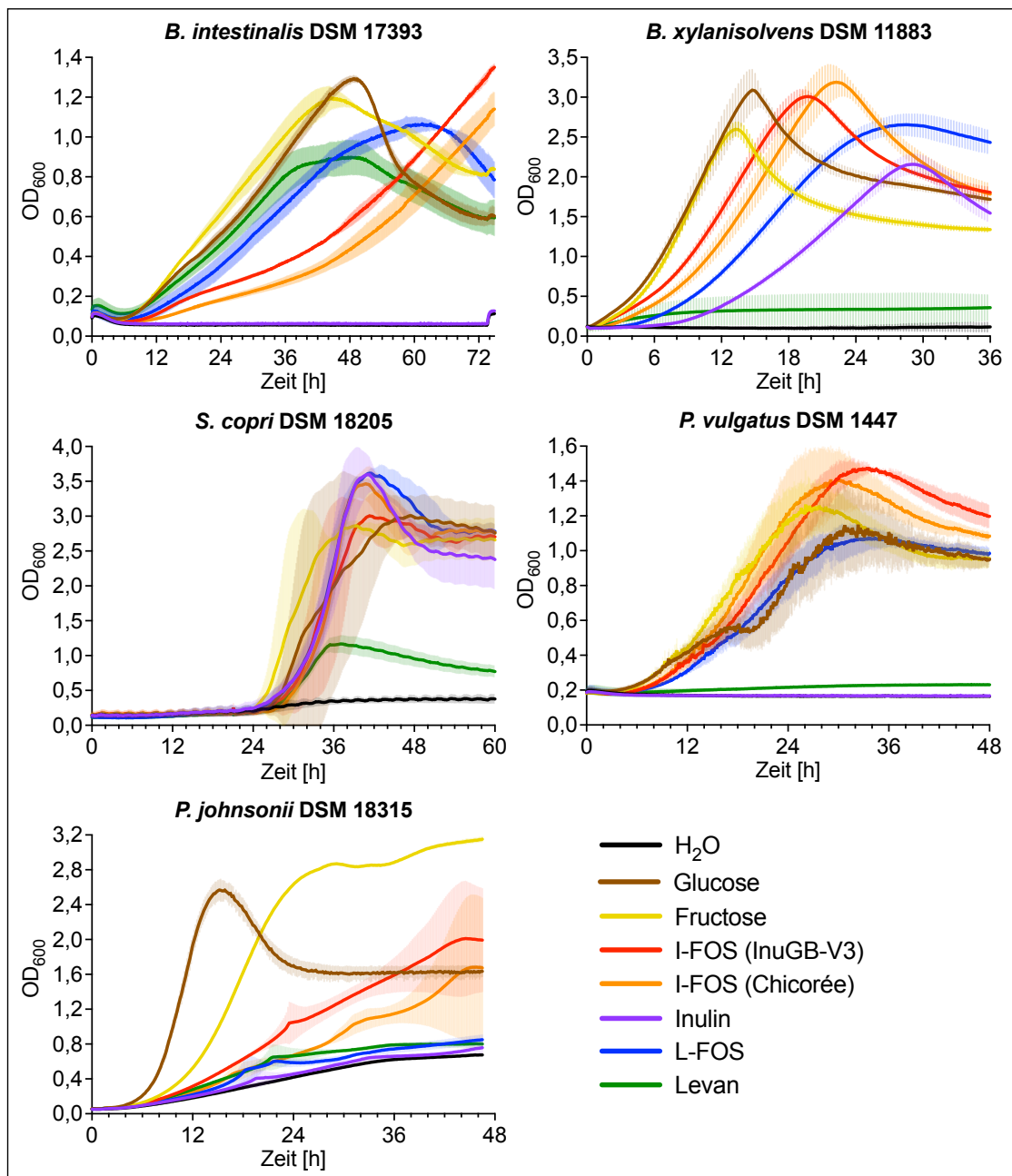
Die untersuchten Bacteroidota-Bakterien stellten sich als besonders fähig zum Abbau der Fructane heraus (Abb. 34). *P. johnsonii* konnte beide I-FOS-Substrate nutzen, wobei die mit InuGB-V3-Rohenzym synthetisierten I-FOS besser verwertet wurden als die aus Chicorée hergestellten I-FOS. Dies äußerte sich in einer verlängerten lag-Phase und niedrigeren Wachstumsrate bei Wachstum auf den I-FOS (Chicorée) im Vergleich zu Wachstum auf I-FOS (InuGB-V3) (Abb. 34).

*P. vulgatus* konnte alle FOS ausgezeichnet zum Wachstum nutzen. Das Wachstum bei Kultivierung auf I-FOS (InuGB-V3) und I-FOS (Chicorée) ähnelte sich sehr. Mit diesen Substraten konnten im Vergleich zum Wachstum auf Fructose ähnliche Wachstumsraten sowie deutlich höhere Zelldichten erreicht werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass *P. vulgatus* die L-FOS ähnlich gut nutzen konnte wie Glucose, jedoch schlechter als Fructose oder I-FOS (Abb. 34).

Ähnlich hierzu wurde bei der Kultivierung von *B. xylanisolvens* beobachtet, dass die bei Supplementation mit den I-FOS erzielten hohen Wachstumsraten und Zelldichten vergleichbar zu den Wachstumsraten und Zelldichten der Glucose- bzw. Fructose-Kontrolle waren, auch wenn das Wachstum auf den I-FOS-Substraten etwas verzögert verlief. Auf L-FOS zeigte *B. xylanisolvens* ein noch stärker verzögertes Wachstum, begründet in einer längeren lag-Phase und einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit. Die maximale Zelldichte glich der bei Wachstum auf Fructose erzielten Zelldichte, blieb jedoch hinter den Biomasse-Ausbeuten bei Kultivierung mit Glucose oder I-FOS zurück. *B. xylanisolvens* konnte Inulin gut metabolisieren. Das Wachstum verlief im Vergleich zu den anderen Substraten langsamer, die erzielte Biomasse-Ausbeute war jedoch nur um etwa ein Fünftel geringer als bei Wachstum auf den Kontrollen (Abb. 34).

Bei den Kulturen von *B. intestinalis* wurde Wachstum auf Levan mit ähnlichen Wachstumsraten wie auf Glucose und Fructose beobachtet. Die max. Zelldichte war jedoch um ein Viertel geringer als bei Wachstum auf Glucose und Fructose (Abb. 34). L-FOS konnten sehr gut von *B. intestinalis* genutzt werden. Die erreichte Wachstumsrate und Biomasse-Ausbeute waren nur geringfügig niedriger als bei Kultivierung auf Glucose und Fructose. Im Gegensatz dazu wurden bei Wachstum auf den I-FOS-Substraten ebenso hohe Zelldichten erzielt wie bei den Kontrollen zu beobachten war. Allerdings verlief das Wachstum verzögert, da in der ersten Phase des biphasischen Wachstums deutlich geringere Wachstumsraten als bei den anderen Substraten erzielt wurden.

*S. copri*, der auch Levan teilweise verstoffwechseln konnte, zeigte ein sehr ausgeprägtes Wachstum auf Inulin und den FOS. Die lag-Phase war bei Wachstum auf Inulin, I-FOS und L-FOS zwar etwas länger als bei Wachstum mit Glucose und Fructose, es wurde jedoch eine höhere Wachstumsrate und Zelldichte erzielt als mit den Glucose- und Fructose-Kontrollen. Nur bei Wachstum auf I-FOS (InuGB-V3) entsprach die maximale Zelldichte den Kulturen, die mit Glucose



**Abbildung 34. Wachstum von *B. xylanisolvens* DSM 11883, *B. intestinalis* DSM 17393, *S. copri* DSM 18205, *P. vulgatus* DSM 1447 und *P. johnsonii* DSM 18315 auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs.** Die Kultivierung erfolgte im Triplikate in 48-well-Mikrotiterplatten in einem Mikroplatten-Lesegerät unter  $N_2/CO_2$ -Atmosphäre. In einem finalen Volumen von 600  $\mu L$  wurden die Kulturmedien mit 100 mM Bis-Tris-Puffer und 30 mM Kohlenstoffquelle (bezogen auf die enthaltenen Monomer-Einheiten) vermischt. Es wurde das Wachstum auf Glucose, Fructose, den in dieser Arbeit hergestellten I-FOS (I-FOS InuGB-V3), aus Chicorée-Inulin hergestellten I-FOS (I-FOS Chicorée, Megazyme Inc.), Inulin aus Chicorée (Megazyme Inc.), bakteriellem Levan (Pohlentz et al. 2022) oder L-FOS, welche durch Hydrolyse des verwendeten Levans hergestellt wurden (Pohlentz et al. 2022), untersucht. Der  $H_2O$ -Kontrolle wurde keine Kohlenstoffquelle zugegeben. Nach Inokulation mit 3,4 % [v/v] Vorkultur erfolgte die Kultivierung bei 37 °C. Die Absorption bei 600 nm wurde alle 5-10 min gemessen. Verwendete Medien und der pH-Wert des Puffers sind Kapitel 2.4.4, Tabelle 14 zu entnehmen, verwendete Medien-Zusätze sind in Kapitel 2.4.3. zu finden.

und Fructose supplementiert waren. Im Gegensatz zu dem Wachstum auf den anderen Fructanen, war die Wachstumsrate bei Wachstum auf Levan etwas geringer als bei Wachstum auf den restlichen Substraten. Darüber hinaus entsprach die maximale Zelldichte nur etwa einem Drittel der Zelldichten mit Glucose und Fructose (Abb. 34).

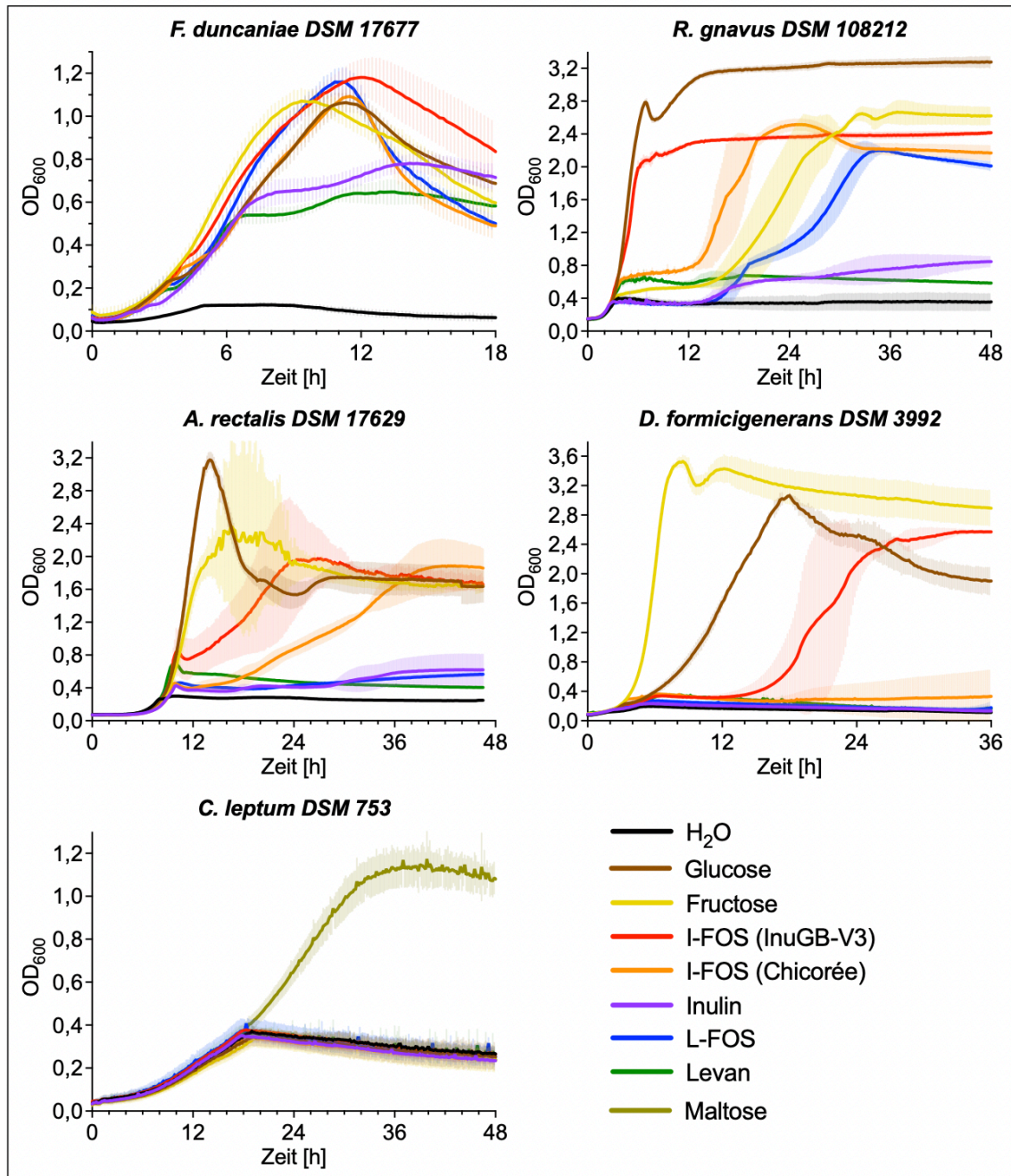
#### 3.7.2.4 Wachstum der Bacillota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

*D. formicigenerans* konnte ausschließlich die I-FOS (InuGB-V3) abbauen, wobei die Kulturen eine geringere Wachstumsrate und maximale Zelldichten erreichten als bei Supplementation mit Glucose und Fructose (Abb. 35).

Auch *A. rectalis* zeigte bei Wachstum auf den I-FOS (InuGB-V3) geringere Wachstumsraten und Zelldichten im Vergleich zu den Glucose- und Fructose-Kontrollen. *A. rectalis* konnte die mit InuGB-V3-Rohenzym synthetisierten I-FOS allerdings besser verwerten als die pflanzenbasierten I-FOS, die mit geringerer Geschwindigkeit abgebaut wurden (Abb. 35).

*R. gnavus* zeigte ausgezeichnetes Wachstum auf I-FOS (InuGB-V3). Die lag-Phase und Wachstumsrate entsprach der bei Kultivierung mit Glucose, wobei eine etwas geringere Biomasse-Ausbeute erzielt wurde. Bei Kultivierung mit Fructose, I-FOS (Chicorée) und L-FOS wurden ähnliche Biomasse-Ausbeuten erreicht wie bei Wachstum auf den I-FOS (InuGB-V3). Allerdings waren die lag-Phasen stark verlängert. Bei den Kulturen mit L-FOS erfolgte das Wachstum zudem biphasisch. aufgrund der zweiten lag-Phase war das Wachstum im Vergleich zu den anderen Substraten deutlich verzögert (Abb. 35). Somit konnte *R. gnavus* wie auch *A. rectalis*, *D. formicigenerans* und *P. johnsonii* die I-FOS (InuGB-V3) besser nutzen als I-FOS aus Chicorée (Abb. 34, 35).

*F. duncaniae* konnte sämtliche FOS mit hoher Effizienz zum Wachstum nutzen. Die auf diesen Substraten erzielten Wachstumsgeschwindigkeiten und Zelldichten glichen denen mit den Substraten Glucose und Fructose beobachteten Werten. Das Wachstum von *F. duncaniae* auf den polymeren Fructanen verlief biphasisch und sehr ähnlich zueinander. Die zweite Wachstumsphase war durch eine sehr geringe Wachstumsrate gekennzeichnet und endete in geringen Zelldichten, die etwa zwei Drittel der max. Zelldichte der Glucose- und Fructose-Kontrollen entsprachen. Somit konnte auch *F. duncaniae* die Polymere nicht vollständig verwerten (Abb. 35).



**Abbildung 35. Wachstum von *F. duncaniae* DSM 17677, *R. gnavus* DSM 108212, *A. rectalis* DSM 17629, *D. formicigenerans* DSM 3992, und *C. leptum* DSM 753 auf unterschiedlichen Fructanen des Inulin- und Levan-Typs.** Die Kultivierung erfolgte im Triplikat in 48-well-Mikrotiterplatten in einem Mikroplatten-Lesegerät unter  $N_2/CO_2$ -Atmosphäre. In einem finalen Volumen von 600  $\mu L$  wurden die Kulturmedien mit 100 mM Bis-Tris-Puffer und 30 mM Kohlenstoffquelle (bezogen auf die enthaltenen Monomer-Einheiten) vermischt. Es wurde das Wachstum auf Glucose, Fructose, Maltose (nur *C. leptum*), den in dieser Arbeit hergestellten I-FOS (I-FOS InuGB-V3), aus Chicorée-Inulin hergestellten I-FOS (I-FOS Chicorée, Megazyme Inc.), Inulin aus Chicorée (Megazyme Inc.), bakteriellem Levan (Pohlentz et al. 2022) oder L-FOS, welche durch Hydrolyse des verwendeten Levans hergestellt wurden (Pohlentz et al. 2022), untersucht. Der  $H_2O$ -Kontrolle wurde keine Kohlenstoffquelle zugegeben. Nach Inokulation mit 3,4 % [v/v] Vorkultur erfolgte die Kultivierung bei 37 °C. Die Absorption bei 600 nm wurde alle 5-10 min gemessen. Verwendete Medien und der pH-Wert des Puffers sind Kapitel 2.4.4, Tabelle 14 zu entnehmen, verwendete Medien-Zusätze sind in Kapitel 2.4.3. zu finden.

### 3.7.2.5 Fähigkeit der untersuchten Darmbakterien zum Fructan-Abbau

Lediglich *C. leptum* und *C. intestinalis* konnten keines der eingesetzten Fructane abbauen (Abb. 33, 34, 35). Die restlichen neun untersuchten Bakterienstämme waren fähig, mindestens eines der Fructane zum Wachstum zu nutzen. Es war auffällig, dass mehr Bakterienstämme dazu in der Lage waren FOS zu metabolisieren (neun von elf Bakterien) als die polymeren Fructane (vier von elf Bakterien) und mehr Bakterien die I-FOS-Substrate nutzen konnten als die L-FOS. Zudem ermöglichten die FOS-Substrate in den meisten Fällen stärkeres Wachstum als die polymeren Fructane.

*D. formicigenerans* wuchs ausschließlich auf I-FOS (InuGB-V3) (Abb. 35). Dahingegen wurde bei *A. rectalis* und *P. johnsonii* eine Zunahme der Zelldichte sowohl in den Kulturen mit I-FOS (InuGB-V3) als auch mit I-FOS (Chicorée) nachgewiesen (Abb. 34, 35). *R. gnavus* und *P. vulgatus* konnten neben den I-FOS zudem die L-FOS abbauen (Abb. 34, 35). Während *B. xylanisolvens* zusätzlich zu den FOS auch das Polymer Inulin verstoffwechseln konnte, zeigte *B. intestinalis* Wachstum auf Levan (neben Wachstum auf den FOS) (Abb. 34). *F. duncaniae* und *S. copri* erwiesen sich als besonders fähig zum Abbau der Fructane, da sie in der Lage waren auf allen angebotenen Fructanen zu wachsen (Abb. 34, 35). Zusammengefasst konnten drei der untersuchten Bacteroidota-Bakterien alle FOS und mind. ein polymeres Fructan zum Wachstum nutzen, während *F. duncaniae* das Einzige untersuchte Bacillota-Bakterium war, welches dazu ebenfalls in der Lage war. Somit war die Fähigkeit zum Fructan-Abbau im Schnitt stärker bei den untersuchten Bacteroidota-Bakterien vertreten als bei den Bacillota-Bakterien (Abb. 34, 35).

Das Wachstum von *P. johnsonii*, *B. intestinalis*, *A. rectalis* und *D. formicigenerans* auf den I-FOS, von *F. duncaniae* auf den polymeren Fructanen und von *R. gnavus* auf den L-FOS verlief biphasisch (Abb. 34, 35). Biphasisches Wachstum weist darauf hin, dass die Substrat-Komponenten, wahrscheinlich abhängig von ihrem DP, mit verschiedener Präferenz und über unterschiedliche Mechanismen abgebaut wurden. Die zweite lag-Phase spricht dafür, dass ein Wechsel der Genexpression notwendig war, um die entsprechenden Substrat-Bestandteile metabolisieren zu können (Scott et al. 2014). Auch eine im Vergleich zu den Monosaccharid-Kontrollen verstärkte erste lag-Phase weist auf eine notwendige Änderung der Genexpression hin.

Zudem wurde beobachtet, dass viele der untersuchten Bakterien bei Wachstum auf einigen Fructan-Substraten im Vergleich zum Wachstum auf Glucose- bzw. Fructose eine geringere Biomasse-Ausbeute erreichten (Abb. 34, 35). Somit konnten diese Fructane nicht vollständig von den Darmbakterien metabolisiert werden. Möglicherweise waren die Bakterien in diesen Fällen nur in der Lage, die in den Substraten enthaltenen kurzkettigen FOS abzubauen, und konnten nicht weiterwachsen, nachdem diese bereits aufgebraucht waren (Scott et al. 2014). Besonders deutlich

wurde die unvollständige Substrat-Nutzung bei der Kultivierung von *S. copri* mit Levan, *F. duncaniae* auf Inulin und Levan sowie bei Kultivierung von *P. johnsonii* auf den I-FOS (Abb. 34, 35). Im Gegensatz dazu konnte *P. vulgatus* die I-FOS-Substrate, *F. duncaniae* alle FOS und *S. copri* alle FOS sowie Inulin ebenso gut zum Wachstum nutzen wie Glucose bzw. Fructose (Abb. 34, 35). *R. gnavus*, *A. rectalis*, *D. formicigenerans* und *P. johnsonii* zeigten bei Kultivierung mit den in dieser Arbeit durch InuGB-V3 synthetisierten I-FOS ein stärkeres Wachstum als mit den pflanzenbasierten I-FOS (Chicorée). Zudem konnten die I-FOS (InuGB-V3) besser zum Wachstum genutzt werden als das polymere Inulin (einzige Ausnahme *S. copri*) (Abb. 34, 35). Diese überlegenen wachstumssteigernden Eigenschaften der I-FOS (InuGB-V3) gegenüber den anderen Fructan-Substraten eröffnen die Möglichkeit, die bakteriellen I-FOS selektiv zur Förderung einiger Darmbakterien einzusetzen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Die Bedeutung der menschlichen Darmmikrobiota für die Gesundheit

Der Gastrointestinaltrakt des Menschen wird von einer diversen und äußerst komplexen Gemeinschaft aus Billionen Bakterien, Viren, Archaeen, Pilzen und Protisten besiedelt, die sogenannte Darmmikrobiota (Eckburg et al. 2005; Gomaa 2020; Sender et al. 2016). Während Viruspartikel vermutlich zahlenmäßig am häufigsten vertreten sind (Mukhopadhyaya et al. 2019) bestimmen Bakterien die Mehrzahl an lebenden Organismen im Darm gesunder Menschen (Woting und Blaut 2016) und sind besser untersucht als die anderen Mitglieder der Darmmikrobiota (Gomaa 2020). Aufgrund der hohen Anzahl und Diversität der Mikroorganismen, bringt die Darmmikrobiota ein beeindruckendes Kollektiv an Genen (Mikrobiom) mit sich, dass die Anzahl der Gene des Menschen um das etwa 150-fache übersteigt (Qin et al. 2010). Aufgrund dieser genetischen Vielfalt kann das Mikrobiom den Wirt funktionell komplementieren (Qin et al. 2010).

Mit fortschreitender Erforschung wird immer ersichtlicher, dass die Darmmikrobiota von äußerster Wichtigkeit für die Funktionalität des menschlichen Körpers ist und einen entscheidenden Einfluss auf die Erhaltung des Gleichgewichts der physiologischen Körperfunktionen und somit auf die Gesundheit bzw. Erkrankung des Menschen hat (Thursby und Juge 2017).

#### 4.1.1 Darmmikrobiota-Zusammensetzung

Mit dem Ziel, die „normale“ Darmmikrobiota zu definieren wurde deren Zusammensetzung unter Anwendung von *Next-Generation-Sequencing*-Technologien und groß angelegten Metagenom-Studien tiefgreifend untersucht (Illiano et al. 2020; Thriene und Michels 2023). Auf diese Weise wurden mehr als 1000 Bakterienspezies identifiziert, die im menschlichen Darm vorkommen, wobei ein einzelner (gesunder) Mensch mindestens 400 Bakterienspezies im Darm beherbergt (Claesson et al. 2009; Illiano et al. 2020). In Erwachsenen können etwa 90 % der identifizierten Bakterien den Phyla Bacteroidota (ehem. Bacteroidetes) und Bacillota (ehem. Firmicutes) zugeordnet werden (Arumugam et al. 2011; King et al. 2019). Weitere häufig vertretene Bakterien gehören den Phyla Actinomycetota (ehem. Actinobacteria) und Pseudomonadota (ehem. Proteobacteria) an (King et al. 2019). Die am häufigsten nachgewiesenen Bakteriengattungen sind *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* und *Prevotella* (Bacteroidota), *Faecalibacterium*,

*Roseburia*, *Ruminococcus* und *Blautia* (Bacillota), *Escherichia* (Pseudomonadota) sowie *Bifidobacterium* und *Collinsella* (Actinomycetota) (Arumugam et al. 2011; King et al. 2019; Shapira 2016).

Die bakteriellen Gemeinschaften, die den Dün- und Dickdarm bzw. den mukosalen und luminalen Bereich des Darms besiedeln, unterscheiden sich voneinander (Donaldson et al. 2016; Thursby und Juge 2017). Während in der Mukus-Schicht vor allem Bacillota vorkommen, sind im luminalen Bereich vermehrt Vertreter der Bacteroidota anzutreffen (Thursby und Juge 2017). Der Dünndarm bietet aufgrund seiner kurzen Transitzeit für die Nahrung und dem Vorhandensein hoher Mengen an Säuren, Sauerstoff und antimikrobiellen Substanzen nur begrenzte Wachstumsbedingungen (Donaldson et al. 2016). Im Vergleich zum Dickdarm beherbergt der Dünndarm weniger Bakterienarten und eine geringere Bakterienanzahl (Kastl et al. 2020). Die Dünndarmmikrobiota ist dynamisch und kann sich schnell an veränderte Bedingungen anpassen (Kastl et al. 2020). Vermutlich besiedeln nur schnellwachsende, fakultativ anaerobe Bakterien, die an die Schleimhaut adhären können, den Dünndarm (Donaldson et al. 2016). Im Dünndarm sind Lactobacillaceae und Enterobacteriaceae die vorherrschenden Bakterien-Familien (Donaldson 2016). Im Gegensatz dazu ist der Dickdarm äußerst dicht besiedelt und weist eine diverse Mikrobiota auf (Thursby und Juge 2017). Schätzungen zufolge befinden sich im Kolon etwa  $3,8 \times 10^{13}$  Bakterien, was in etwa der Anzahl aller Zellen entspricht, die den menschlichen Körper bilden (Sender 2016). Anaerobe Bakterien, die komplexe Kohlenhydrate abbauen können, dominieren im Dickdarm (Thursby und Juge 2017). Zu den häufig nachgewiesenen Familien gehören Bacteroidaceae, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae (King et al. 2019).

Trotz der vielen Erkenntnisse bezüglich der mikrobiellen Gemeinschaft, die den menschlichen Darm besiedelt, ist zurzeit noch unklar, wie eine „normale“ oder „gesunde“ Darmmikrobiota zu definieren ist, da es auf taxonomischer Ebene große Variationen der Bakterien-Population in gesunden Menschen gibt (Fan und Pedersen 2021). Ungeachtet der Unterschiede in der Zusammensetzung konnte jedoch beobachtet werden, dass zwischen der Darmmikrobiota verschiedener gesunder Menschen einige funktionelle Eigenschaften konserviert sind, sodass die Bakteriengemeinschaften ähnliche metabolische Aktivitäten aufweisen (Moya und Ferrer 2016). Dieses funktionelle Kern-Metagenom kann von verschiedenen Spezies gestellt werden und ist vermutlich für die korrekte Funktion des Darmökosystems notwendig (Qin et al. 2010). Im Allgemeinen wird angenommen, dass eine gesunde Darmmikrobiota durch eine stabile Kern-Funktion des Mikrobioms, eine hohe Taxa-Diversität und einen großen Reichtum an mikrobiellen Genen gekennzeichnet ist. Diese Eigenschaften ermöglichen es den Mikroorganismen, sich funktional zu ergänzen, wodurch die Robustheit der Mikrobiota gegenüber Umwelteinflüssen erhöht ist (Huttenhower et al. 2012; Valdes et al. 2018).

#### 4.1.2 Funktionen der Darmmikrobiota

Die Darmmikrobiota bringt aufgrund einer Reihe an physiologischen Funktionen eine Vielzahl an Vorteilen für den Wirt mit sich (Thursby und Juge 2017). Diese Bakterien-Gemeinschaft schützt den Wirt durch Kolonisierung der intestinalen Schleimhäute sowie der Produktion von antimikrobiellen Substanzen vor Pathogenen (Gomaa 2020). Zudem ist die Bakterienpopulation des Darms an der Formung und Stärkung des intestinalen Epitheliums beteiligt und trägt zum Erhalt der Integrität der mukosalen Barriere bei (Natividad und Verdu 2013). Die Darmmikrobiota spielt eine essenzielle Rolle bei der Verdauung im Allgemeinen sowie der Absorption und Bereitstellung von Nährstoffen. Die Darmmikroorganismen synthetisieren eine Reihe an Stoffen, die den Wirt beeinflussen, wie essenzielle Vitamine (z. B. Vitamin B12, Folsäure, Vitamin K und Riboflavin), SCFAs, verzweigte Fettsäuren, Cholin, Purine, Phenole und sekundäre Gallensäuren (Thursby und Juge 2017). Darüber hinaus unterstützt die Darmmikrobiota die Entwicklung, Regulation und Verbesserung des Wirtsimmunsystems (Thursby und Juge 2017).

Die Darmmikrobiota übt einen so weitreichenden Einfluss aus, dass eine bidirektionale Interaktion zwischen der bakteriellen Darm-Population, Darmgewebe und Gehirn identifiziert wurde, die als Mikrobiota-Darm-Hirn-Achse bezeichnet wird (Cryan et al. 2019). Mittels dieser Interaktion beeinflusst die Darmmikrobiota die Funktion des enterischen und zentralen Nervensystems (Margolis et al. 2021). Die Signalübertragung erfolgt auf direkte oder indirekte Weise, wobei bereits mehrere Kommunikationswege identifiziert wurden, darunter das Immunsystem, der Tryptophan-Metabolismus, der Vagusnerv und das enterische Nervensystem (Cryan et al. 2019). Dieses Kommunikationssystem beruht darauf, dass die Mikroorganismen im Darm eine Vielzahl metabolischer, immunologischer und neurochemischer Faktoren produzieren und modifizieren können, die letztendlich das Nervensystem beeinflussen (Morais et al. 2021).

#### 4.1.3 Dysbiose der Darmmikrobiota

Im gesunden Zustand entspricht die Beziehung zwischen Wirt und Darmmikrobiota einer mutualistischen Symbiose (Riccio und Rossano 2020; Thriene und Michels 2023). Allerdings wurden inzwischen zahlreiche nicht-übertragbare Krankheiten mit einer deutlichen und für die Erkrankung spezifischen Veränderung der Zusammensetzung, Diversität und Funktion der Darmmikrobiota in Zusammenhang gebracht (Fan und Pedersen 2021). Eine solche Krankheitsbezogenen Abweichung der Darmmikrobiota wird als Dysbiose bezeichnet und wurde u. a. bei Herz-Kreislauf-, Stoffwechsel-, Atemwegs-, Nerven und Krebserkrankungen beobachtet (Illiano et al. 2020).

Neben der reinen Analyse der taxonomischen Zusammensetzung der Darmmikrobiota wird diese vermehrt in Kombination mit Untersuchungen an Zellkulturen, Tiermodellen und Menschen durchgeführt, um potenzielle molekulare Mechanismen hinter der Assoziation von Dysbiose und Krankheit zu finden (Fan und Pedersen 2021). Insbesondere Studien an Tiermodellen haben Hinweise auf eine Beteiligung der Darmmikrobiota an bestimmten Erkrankungen geliefert. Dennoch bleibt weitgehend ungeklärt, ob die Dysbiose die Ursache, die Folge oder lediglich eine Begleiterscheinung der assoziierten Erkrankung ist (Walter et al. 2020). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass eine Dysbiose den Fortgang der entsprechenden Erkrankung verschlimmert (Thursby und Juge 2017).

#### 4.1.4 Einflussfaktoren auf die Darmmikrobiota

Die beobachteten Variationen in der Darmmikrobiota zwischen einzelnen Menschen, aber auch Veränderungen der Bakterien-Population im Verlauf des Lebens eines Menschen sind vermutlich nicht zuletzt darauf zurückzuführen, dass der Darm ein multifaktoriell beeinflusstes Habitat darstellt und die Darmmikrobiota stets eine gewisse Wandelbarkeit beibehält. Diese Plastizität ist bei der Geburt sehr hoch und nimmt mit zunehmendem Alter ab. Im Erwachsenenalter ist die mikrobielle Gemeinschaft weitestgehend stabil, bleibt jedoch für diverse Einflüsse empfänglich (Thriene und Michels 2023). Neben dem Alter beeinflussen Genetik und Geschlecht des Wirtes, Umweltfaktoren sowie Lebensstil des Wirtes die Zusammensetzung der Darmmikrobiota. So modulieren u.a. die Art der Geburt, operative Eingriffe und bakterielle Infektionen, Einnahme von Medikamenten (insbesondere Antibiotika), Rauchen, sportliche Aktivität sowie psychische Erkrankungen wie Depressionen die mikrobielle Gemeinschaft (Gomaa 2020; Thursby und Juge 2017).

Eine der wichtigsten Triebkräfte zur Formung der Darmmikrobiota ist die Ernährung (Illiano et al. 2020). Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Umstellung von einer Ballaststoff-reichen und Fett-armen Ernährung auf eine Fett-reiche und Ballaststoff-arme Ernährung zu einer Reduktion der Artenvielfalt und gleichzeitig zu einer erhöhten interindividuellen Variabilität der Darmmikrobiota führt (Kolodziejczyk et al. 2019). Eine Fett- und Protein-reiche Ernährung korreliert mit Gallensäure-toleranten Spezies wie *Bacteroides*, *Bilophila* und *Alistipes* und der Reduktion von Bacillota-Bakterien (David et al. 2014; Forouhi et al. 2018). Diese Art der Ernährung steht im Zusammenhang mit einer reduzierten Immunität, höherer Empfänglichkeit für Infektionen und der Entwicklung von metabolischen Erkrankungen (Jethwani und Grover 2019).

Im Gegensatz dazu ist eine vegetarische Ernährung, bzw. eine Ernährung, die viel Gemüse und Vollkorngetreide enthält und somit Ballaststoff-reich ist, mit Gesundheit, hoher bakterieller Diversität und Dominanz von Bacillota- und Bacteroidota-Bakterien assoziiert (Gomaa 2020; Thursby und Juge 2017). Grundsätzlich kommen Ballaststoffen eine besondere Bedeutung bei der Modulation der Darmmikrobiota und bei der Darmgesundheit zu (Fu et al. 2022; Gomaa 2020). Die Supplementation mit resistenter Stärke oder Weizenkleie führte in der Studie von Walker et al. (2011) zu einer starken und reproduzierbaren Anreicherung von verschiedenen bakteriellen Spezies im Darm, darunter *Ruminococcus*, *Collinsella* und *Eubacterium*-Spezies. Die Einführung einer Ballaststoff-reichen Ernährung förderte das Wachstum von SCFA-produzierenden Bakterien bei Pateinten mit Typ-2-Diabetes und führte zu einer verbesserten Blutzuckerregulation (Zhao et al. 2018). Darüber hinaus wurde in zwei Studien gezeigt, dass der Ballaststoff Inulin essenziell ist, um die Gesundheit und Integrität der Barrierefunktion des Darms zu erhalten, da durch den Verzehr von Inulin die intestinale Mukosa vor Degradation geschützt wird (Ray 2018).

Aufgrund der Bedeutung von Ballaststoffen für die Gesundheit und deren Einfluss auf die Darmmikrobiota wurde in dieser Arbeit ein Verfahren zur Produktion von I-FOS entwickelt. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Metabolisierung von Fructanen durch Darmbakterien durchgeführt.

#### **4.1.5 Modulation der Darmmikrobiota durch Präbiotika**

Die Verbindung zwischen den Darmbakterien und einer Vielzahl an intestinalen und extra-intestinalen Erkrankungen macht die Darmmikrobiota zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für Therapie-Strategien zur Prävention und Behandlung von verschiedenen Krankheitszuständen, die mit Veränderungen der Darmmikrobiota assoziiert sind (Fan und Pedersen 2021). Die Möglichkeit, die Mikrobengemeinschaft zu modulieren und so von einem dysbiotischen in einen gesundheitsförderlichen Zustand zu überführen, ist von großem Interesse. In diesem Zusammenhang erweist sich die Beeinflussung der Darmmikrobiota durch verschiedene Faktoren wie der Ernährung möglicherweise als vorteilhaft. Es werden derzeit verschiedene gezielte und ungezielte Mikrobiota-gerichtete Strategien untersucht. Gezielte Strategien umfassen den Einsatz von Medikamenten die ausgewählte mikrobielle Stoffwechselwege beeinflussen, Phagentherapie, mittels Bioengineering veränderte Mikroorganismen und CRISPR-Cas-basierte Methoden. Zu den ungezielten Ansätzen, die eine umfassende Verbesserung der mikrobiellen Zusammensetzung und Funktion anstreben, gehören Fäkaltransplantationen, individualisierte Ernährung sowie die Anwendung von Pro- und Präbiotika (Fan und Pedersen 2021).

Das Ziel der Anwendung von Präbiotika besteht darin, das Wachstum und den Metabolismus bestimmter Bakterien zu stimulieren, so dass die Zusammensetzung und Aktivität der Darmmikrobiota zu einer Reihe von gesundheitlichen Vorteilen führt (Adamberg et al. 2015). Durch den Verzehr eines Präbiotikums erhalten Bakterien-Spezies, die gut an die Nutzung dieses Substrates angepasst sind, einen Wettbewerbsvorteil und werden in ihrem Wachstum gefördert. Dadurch kann eine Veränderung der Zusammensetzung der Darmmikrobiota erwirkt werden (Sonnenburg et al. 2010). Insbesondere von der Stimulation von SCFA-Produzenten verspricht man sich einen großen gesundheitlichen Vorteil bei der Behandlung von Dysbiose-assoziierten Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes (Zhao et al. 2018), denn SCFAs sind von Darmbakterien produzierte Faktoren mit regulatorischen Eigenschaften, denen zahlreiche gesundheitsförderliche Eigenschaften nachgewiesen wurden.

SCFAs sind die Hauptendprodukte des anaeroben Stoffwechsels von Mikroorganismen im Darm und entstehen insbesondere bei der Fermentation von komplexen Kohlenhydraten (Koh et al. 2016). Acetat, Propionat und Butyrat sind die primären SCFAs die im menschlichen Darm nachgewiesen werden. Diese SCFAs liegen im Darm in einem Verhältnis von etwa 3:1:1 vor (Cummings et al. 1987). Die von den Bakterien freigesetzten SCFAs können von den Epithelzellen im Kolon (Kolonozyten) aufgenommen werden (Zeng et al. 2019). Butyrat wird von den Kolonozyten bevorzugt als Substrat genutzt und nahezu vollständig von den Darmepithelzellen metabolisiert. Die verbleibenden SCFAs gehen über die Leberpfortader in den Blutkreislauf über (Cummings et al. 1987). Zuvor werden große Mengen des Propionats in der Leber metabolisiert, sodass im peripheren Blutkreislauf hauptsächlich Acetat und nur geringe Konzentrationen von Butyrat und Propionat zu finden sind (Cummings et al. 1987).

SCFAs spielen eine entscheidende und vielseitige regulatorische Rolle im Körper. Die Verbindungen sind beteiligt an der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase, immunologischen Prozessen, der Darmbarriere, der Neurobiologie, der Skelettfunktionen, der Glucosehomöostase und dem Blutfettprofil. Darüber hinaus weisen diese Verbindungen wichtige anti-inflammatorische und anti-karzinogene Eigenschaften auf (Koh et al. 2016). Insbesondere Butyrat nimmt eine Schlüsselrolle in der Gesundheit des Dickdarms ein. Diese organische Säure deckt etwa 70 % des Energiebedarfs der Kolonozyten (Roediger 1980) und ist an der Zell-Proliferation, -Differenzierung und -Apoptose der Kolonozyten beteiligt. Zudem hemmt Butyrat die Migrations- und Invasionsrate von Krebszellen im Dickdarm (Zeng et al. 2019). Immer mehr gesundheitliche Funktionen werden SCFAs zugeschrieben, von denen an dieser Stelle einige genannt werden sollen.

SCFAs wirken unter anderem als wichtige Signalmoleküle im Körper. Sie binden an spezifische Rezeptoren der Wirtszellen (*free fatty acid receptors* und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) und aktivieren darüber komplexe Signalwege in verschiedenen Organen und Geweben (Koh et al. 2016). Im Blutkreislauf zirkulierende SCFAs beeinflussen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke, indem diese Verbindungen die Produktion von *Tight Junction*-Proteinen erhöhen, was den Eintritt von unerwünschten Metaboliten in das Gehirngewebe reduziert (Mohajeri et al. 2018). Acetat kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und über einen zentralen homöostatischen Mechanismus die Reduktion des Appetits bewirken (Frost et al. 2014). Butyrat und in geringerem Maße Propionat wirken als Inhibitoren von Histon-Deacetylasen, was sie zu wichtigen anti-inflammatorischen und anti-karzinogenen Wirkstoffen macht. Diese Wirkungen beruhen auf der Veränderung der Expression von Genen mit verschiedenen Funktionen, darunter Zell-Proliferation, -Apoptose und -Differenzierung, sowie auf der Regulation der Cytokin-Ausschüttung durch T-Zellen (Koh et al. 2016). Zudem trägt Butyrat zur Stärkung der Darmbarriere bei, indem es den Aufbau von *Tight-Junction*-Proteinen und die Mucin-Synthese reguliert (Morrison und Preston 2016).

Acetat kann von acetogenen Bakterien aus  $H_2$  und  $CO_2$  oder aus Formiat über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg hergestellt werden. Allerdings wird nur ein geringer Anteil des Acetats im Darm von acetogenen Bakterien gebildet. Vielmehr wird diese Verbindung von den meisten nicht-acetogenen Darmbakterien als Fermentationsprodukt aus Pyruvat hergestellt. Um die im oxidativen Teil der Gärungswege entstandenen Reduktionsequivalente vollständig abzuführen, müssen in vielen Fällen weitere reduzierte Metabolite zusätzlich zu Acetat produziert werden. Abhängig von den vorhandenen Stoffwechselwegen werden insbesondere Succinat, Propionat, Butyrat, Formiat, Lactat oder Ethanol produziert. Die Anteile der verschiedenen Fermentationsprodukte variieren abhängig von den verfügbaren Substraten und den im Darm herrschenden Bedingungen (Louis et al. 2014). Die Produktion von Propionat und Butyrat erfolgt durch spezialisierte Bakterien, die zumeist unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen angehören (Zeng et al. 2019). Vor allem Bakterien aus dem Phylum Bacteroidota, aber auch einige Bacillota-Bakterien können Propionat produzieren. Dazu gehören *Bacteroides* spp., *Dialister* spp., und *Veillonella* spp. (Louis et al. 2014) bzw. *Roseburia inulinivorans* und *Ruminococcus gnavus* (Crost et al. 2013; Reichardt et al. 2014; Scott et al. 2006). Butyrat-Produzenten sind vornehmlich den Bacillota-Bakterien zuzuordnen. Die primären Butyrat-Produzenten im Darm sind vermutlich *Anaerostipes* spp., *F. duncaniae*, *A. rectalis* und *Coprococcus* spp. (Louis et al. 2014).

Dass die Produktion der SCFAs auf bestimmte Bakterien zurückzuführen ist, könnte die Beeinflussung der Produktion dieser Stoffe durch eine Modulation der Darmmikrobiota

ermöglichen (Zeng et al. 2019). Zahlreiche Studien belegen, dass der Verzehr von Präbiotika und anderen Ballaststoffen das Wachstum von SCFA-produzierenden Bakterien fördert (Fu et al. 2022). Je nach Art des Ballaststoffes wurden verschiedene Veränderungen der Darmmikrobiota beobachtet (Fu et al. 2022). Auch zu dem in dieser Arbeit produzierten Präbiotikum Inulin existieren eine Reihe von Publikationen, die die Wirkung der Verbindung auf die Bakterien im menschlichen Darm beleuchten. Zum Beispiel führte der Verzehr von Inulin in Interventionsstudien zu einer erhöhten Abundanz von *Anaerostipes hadrus* (Butyrat-Produzent), *Faecalibacterium* (Butyrat-Produzent), *Alistipes shahii* (Succinat-Produzent) und *Parabacteroides distasonis* (Succinat-Produzent) (Baxter et al. 2019; Frolova et al. 2022; Healey et al. 2018; Kiewiet et al. 2021; Parker et al. 2020; Wang et al. 2019).

Dementsprechend wurde in einigen Interventions-Studien auch eine erhöhte SCFA-Konzentration festgestellt. Beispielsweise ergab eine dreiwöchige Ergänzung der Ernährung mit Inulin bei Patienten mit einer Analanastomose und Ileusbeutel einen Anstieg der Butyrat-Konzentration (Welters et al. 2002). In der Studie von Baxter et al. (2019) führte der Verzehr von Inulin zu einem allgemeinen Anstieg der fäkalen SCFA-Konzentration, jedoch ohne eine Veränderung des relativen Anteils der einzelnen SCFAs. Ähnlich hierzu wurden nach der Fütterung von Ratten mit I-FOS erhöhte SCFA-Mengen (Cherbut et al. 2003) bzw. erhöhte Butyrat-Konzentrationen im Darm beobachtet (Le Blay et al. 1999). Trotz einer erhöhten Anzahl von SCFA-Produzenten im Darm wurden in anderen Interventions-Studien keine signifikant erhöhten Mengen an SCFAs festgestellt. Vielmehr blieb die SCFA-Konzentration unverändert (Costabile et al. 2010; Healey et al. 2018) oder zeigte sogar eine leichte Abnahme nach der Intervention mit I-FOS bzw. Inulin (Liu et al. 2017).

Es ist allerdings anzumerken, dass in den meisten Studien lediglich die SCFA-Konzentration in Stuhlproben analysiert wird. Dies spiegelt nur begrenzt wider, wie viel SCFA tatsächlich im Darm produziert wurden, da der Großteil der SCFAs im Darm aufgenommen und nicht ausgeschieden wird (Costabile et al. 2010; Cummings et al. 1987). Holmes et al. (2022) vermuten, dass die Darmmikrobiota eine begrenzte SCFA- bzw. Butyrat-Produktionskapazität besitzt, was zu den variierenden Reaktionen auf die Präbiotika-Interventionen führt. Ihre Untersuchungen unterstützen diese These mit zwei Ergebnissen. In der von ihnen durchgeführten Interventions-Studie war über die Studienteilnehmer hinweg zwar eine proportionale Erhöhung der Butyrat-Konzentration nach der Supplementation mit Inulin festzustellen. Allerdings war zu beobachten, dass diese Zunahme schwächer ausfiel, je höher die gewöhnliche Ballaststoffaufnahme und die basale SCFA-Konzentration der Studienteilnehmer zu Beginn der Studie waren. Zudem ergaben Fermentationsversuche mit Darmmikrobiota-Proben der Probanden, die eine hohe gewöhnliche Ballaststoffaufnahme hatten, dass diese Kulturen bei Supplementation mit Präbiotika weniger



SCFAs produzierten als Kulturen, die mit Stuhlproben von Probanden mit geringerer Ballaststoffaufnahme inokuliert wurden (Holmes et al. 2022).

Neben den indirekt über die Mikrobiota ausgeübten Effekten von Präbiotika zeigen neue Forschungsergebnisse, dass einige dieser Verbindungen auch direkte gesundheitsförderliche Wirkung haben, indem sie mit Epithel- und Immunzellen im Darm interagieren (Chen und de Vos 2023). Inulin, I-FOS, GOS, HMOs und Gramminan können die Barriere- und Immunfunktion des Darms beeinflussen, wobei die Modulations-Wirkungen der Präbiotika Struktur- und DP-abhängig sind (Chen und de Vos 2023; Fernández-Lainez et al. 2022). Besonders die in dieser Arbeit untersuchten Präbiotika (Inulin und deren abgeleitete Oligosaccharide) zeigten deutliche Effekte. Sowohl I-FOS als auch Inulin stärken die Darmbarriere-Funktion, indem diese Verbindungen die Expression von *Tight-Junction*-Proteinen erhöhen. Der schützende Effekt von I-FOS auf die Integrität des Darmepithels ist besonders hoch (Akbari et al. 2017; Chen et al. 2017b; Vogt et al. 2014). Die unterschiedlichen immunmodulatorischen Effekte von Inulin-artigen Fructanen beruhen auf ihrer Interaktion mit einigen *Toll-Like*-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen. Durch die Bindung an die *Toll-Like*-Rezeptoren wird die Cytokin-Produktion durch die Dendritischen Zellen reguliert (Fernández-Lainez et al. 2022; Vogt et al. 2015). Experiment an Mäusen ergaben, dass sowohl I-FOS als auch Inulin T-Helferzellen in den Peyer-Plaques (Lymphfollikel im Dünndarm) verstärkten und I-FOS zusätzlich regulatorische T-Zellen und eine Unterklasse von Dendritischen Zellen im Mesenteriallymphknoten aktivierten (Fransen et al. 2017; Vogt et al. 2013). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass I-FOS und Inulin auch über die Interaktion mit Becherzellen Entzündungsreaktionen reduzieren können (Fernández-Lainez et al. 2023).

Zusammenfassend besteht ein sehr großes medizinisches Interesse an I-FOS und anderen Präbiotika aufgrund ihrer zahlreichen gesundheitsförderlichen Eigenschaften.

## 4.2 Entwicklung eines Herstellungsprozesses für I-FOS

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die Nachfrage der Konsumenten im Lebensmittelbereich maßgeblich verändert. Es besteht ein wachsendes Interesse an Lebensmitteln, die nicht nur den Hunger stillen und die erforderlichen Nährstoffe liefern, sondern auch das körperliche und geistige Wohlbefinden fördern. Die Lebensmittelproduktion reagiert darauf, indem Firmen verstärkt auf gesundheitsfördernde Aspekte setzen (Siró et al. 2008). Insbesondere die in dieser Arbeit untersuchten I-FOS gewinnen im Zuge dessen an Bedeutung, da die Verbindungen nicht nur

gesundheitsförderliche Wirkungen aufweisen, sondern auch wertvolle technologische Eigenschaften besitzen. Aus diesem Grund finden I-FOS vermehrt Anwendung in Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln und Viehfutter (Nobre et al. 2022). Die steigende Nachfrage hat den Weltmarkt für I-FOS kontinuierlich wachsen lassen (Choukade und Kango 2021). Während im Jahre 1995 etwa 20.000 Tonnen scFOS produziert wurden (Siró et al. 2008), betrug die Produktionsrate für FOS (I-FOS und scFOS) 2015 bereits 134.000 Tonnen (Kruschitz und Nidetzky 2020). Der globale FOS-Markt wird voraussichtlich mit einer erwarteten durchschnittlichen jährlichen Wachstumsrate (CAGR) von 5,0 % im Zeitraum 2021-2026 weiter expandieren und bis 2026 ein Volumen von etwa 2,7 Milliarden USD erreichen (Choukade und Kango 2021).

An I-FOS besteht demnach ein bedeutendes wirtschaftliches Interesse. Allerdings beschränken die hohen Produktionskosten eine breitere Anwendung der I-FOS. Deshalb besteht weiterhin Bedarf an neuen, effizienten biotechnologischen Ansätzen für die Produktion dieser Verbindungen. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit eine alternative I-FOS-Produktionsstrategie unter Anwendung der bakteriellen Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 entwickelt werden.

#### **4.2.1 Optimierung der Produktion von InuGB-V3-Rohenzym**

Die Grundlage für eine wirtschaftlich rentable Produktion von I-FOS ist die kosteneffiziente Herstellung des Biokatalysators, da die Enzymproduktion die kostenintensivste Komponente eines gesamten biotechnologischen Prozesses sein kann (Martins et al. 2019). Um die aufwendige und kostspielige Aufreinigung des Enzyms zu vermeiden, kann Zellextrakt für die Biokonversion verwendet werden. Auf diese Weise können die Produktionskosten für das verwendete Enzym gesenkt werden (Geiger et al. 2016; Splechtna et al. 2007). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit Zellextrakt, der die Inulosucrase InuGB-V3 aus *L. gasseri* DSM 20604 enthielt, als Biokatalysator für die I-FOS-Synthese verwendet. Der Zellextrakt wurde nach der heterologen Proteinproduktion aus den geernteten Zellen des Produktionsstammes *E. coli* BL21 hergestellt. In anderen Arbeiten wurden bereits Zellextrakte, die Fructosyltransferase oder  $\beta$ -Galactosidase enthielten, für die Produktion von scFOS (Lateef et al. 2007) bzw. GOS (Geiger et al. 2016; Splechtna et al. 2007) verwendet.

Im Vergleich zur kürzlich veröffentlichten InuGB-V3-Produktions-Methode (Wienberg et al. 2021) konnte im Lauf dieser Arbeit eine drastische Verbesserung der volumetrischen Produktivität des rekombinanten Proteins erreicht werden. Sehr hohe Aktivitäts- und Proteinausbeuten von über 120.00 U pro Liter *E. coli* bzw. mehr als 130 mg InuGB-V3 pro Liter Produktionskultur konnten durch die Verwendung von TB-Medium gewonnen werden (Kapitel 3.1.2). Da bei einer

chromatographischen Aufreinigung stets ein Teil des Proteins verloren geht, war allerdings anzunehmen, dass die tatsächliche Protein-Menge größer war. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität von InuGB-V3 ( $545 \pm 17 \text{ U mg}^{-1}$ ) und dessen volumetrischer Aktivitätsausbeute betrug die Proteinausbeute ca. 220 mg InuGB-V3 pro Liter Produktionskultur, entsprechend einem Anteil von 25 % am Gesamtprotein. Im Gegensatz dazu wurde in der vorherigen Produktion mit LB-Medium eine Proteinausbeute von etwa 4,0 mg pro Liter Produktionskultur erzielt (Wienberg et al 2021).

Es wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass TB-Medium für die Proteinproduktion in *E. coli* besser geeignet ist als LB-Medium, da sowohl eine höhere Biomasse- als auch Proteinproduktion erreicht werden (Collins et al. 2013; Losen et al. 2004). Losen et al. (2004) konnten nach einer Proteinproduktion mit TB-Medium 10-mal mehr Benzoylformiat-Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* im *E. coli*-Zellextrakt nachweisen als mit LB-Medium. Collins et al. (2013) fanden eine um 70 % erhöhte volumetrische Produktivität eines Silk-Elastin-Linke-Proteins, indem sie den Produktionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) in TB- statt in LB-Medium kultivierten. Die bessere Eignung von TB-Medium basiert auf mehreren Bestandteilen dieses Komplexmediums. Abgesehen davon, dass TB-Medium reicher an komplexen Inhaltsstoffen ist, enthält es die Kohlenstoffquelle Glycerin sowie Kaliumphosphat-Puffer zur pH-Regulation. Dies steht im Gegensatz zum LB-Medium, dem es an Kohlenhydraten und Pufferkapazität mangelt (Rosano und Ceccarelli 2014). Glycerin unterstützt nicht nur das Zellwachstum, ohne die übermäßige Anhäufung von Überschussmetaboliten zu begünstigen, sondern verzögert auch den Abbau von Peptiden und Proteinen zu Ammonium für den Kohlenstoffmetabolismus (Collins et al. 2013). Zusammen mit dem enthaltenen Phosphatpuffer verzögert dies die Alkalisierung des Wachstumsmediums auf pH-Werte, die das Zellwachstum hemmen (Collins et al. 2013).

Der Gehalt an rekombinantem Enzym kann in *E. coli* 40 bis 50 % der Gesamtzellproteine erreichen (Baneyx 1999; Ihling et al. 2018). Trotz der in der vorliegenden Arbeit erzielten hohen volumetrischen Proteinausbeute besteht somit Verbesserungspotential am I-FOS-Produktionsprozess durch die Optimierung der Proteinproduktion. Die Maximierung der Proteinausbeute könnte durch die Anwendung von genetischen Techniken und aufwendigerer Kultivierungsmethoden erfolgen. Gentechnische Maßnahmen, die an verschiedenen Ebenen der Proteinbiosynthese eingesetzt werden, können die Erträge der heterologen Produktion stark erhöhen (Kim et al. 2020). Eine Möglichkeit, höhere Proteinausbeuten zu erzielen, wäre ein Wechsel des Promotors. Ein geeigneter Promotor zur Erzielung hoher Proteinausbeuten ist der T7-Promotor, der von der hochaktiven T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Das Gen für die T7-RNA-

Polymerase wird in der Regel im Genom des Wirts unter der Kontrolle des induzierbaren lacUV5-Promotors platziert (Rosano und Ceccarelli 2014). Unter Verwendung eines Plasmid-basierten T7-Expressionssystems in *E. coli* wurden volumetrische Proteinausbeuten von bis zu 500 mg Protein pro Liter Produktionskultur erzielt (Collins et al. 2013; Losen et al. 2004).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Hochzelllichtfermentation. Die Hochzelllichtfermentation ist eine kosteneffiziente Methode zur Maximierung der volumetrischen Proteinausbeute, indem die Zellmasse erhöht und die Betriebskosten reduziert werden (Shiloach und Fass 2005; Tripathi 2009; Wilms et al. 2001).

Darüber hinaus könnte das Inulosucrase-Gen unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors genomisch integriert werden. Auf diese Weise würde der Produktionsprozess nicht länger ein Antibiotikum und einen Induktor für die Proteinproduktion erfordern, was die Produktionskosten senken und das *Downstream Processing* erleichtern würde. Allerdings lieferte die Integration von *inuGB-V3* in das Genom von *E. coli* BL21 bisher zu geringe volumetrische Aktivitätsausbeuten (Dr. Marcel Hövels, persönliche Mitteilung).

#### **4.2.2 Entwicklung einer hochauflösenden Methode für die isokratische HPLC-Analyse von I-FOS**

Derzeit sind HPLC und HPAEC-PAD (Kapitel 3.2) die gängigsten chromatographischen Methoden für die qualitative und quantitative Analyse von Kohlenhydraten (Sangeetha et al. 2005). Beide Methoden können im isokratischen oder im Gradienten-Elutionsmodus angewendet werden. Gradientenelution bietet eine bessere Peakkapazität (Anzahl der Peaks, die in einer bestimmten Zeit mit einer definierten Auflösung getrennt werden können) für Mehrkomponentenproben als isokratische Methoden. Dahingegen ermöglicht isokratische Elution einen konsistenten Methodentransfer, eine hervorragende Quantifizierung, kurze Equilibrierungszeiten und eine einfache Instrumentierung (Schellinger und Carr 2006). Zur Analyse der enzymatisch hergestellten I-FOS wurde in dieser Arbeit eine zeit- und ressourcensparende HPLC-Methode entwickelt, die alle Vorteile des isokratischen HPLC-Messmodus mit dem Nachweis von kurz- und langkettigen I-FOS kombiniert. Unter Verwendung der Aminophasensäule Eurospher II 100 NH2 (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) wurden I-FOS mit Kettenlängen von bis zu DP 17 als Produkte von InuGB-V3 nachgewiesen. Alle I-FOS von DP3-17 konnten in weniger als 45 Minuten basisliniengetrennt eluiert werden.

Die Validität und Qualität der isokratischen HPLC-Methode wurde durch die Bestimmung der Wiederholpräzision und internen Laborpräzision verifiziert, wofür InuGB-V3-Reaktionsprodukte in *Intraday*- und *Interday*-Messungen eingesetzt wurden. Die so erzielte Variabilität der

Retentionszeiten und Peakflächen war ähnlich zu den von Correia et al. (2014) beschriebenen Werten, die Zucker und I-FOS bis zu einem DP von 5 mittels HPLC-RI analysierten. Die in dieser Arbeit beobachteten Abweichungen waren zufriedenstellend, da die RSD-Werte (Kapitel 3.2.3) für die meisten Verbindungen < 5 % betragen (Correia et al. 2014). Davon ausgenommen waren Fructose und das I-FOS mit DP17, deren Peakflächen-RSD-Werte sehr groß waren. Die hohen RSD-Werte des Monosaccharids hatten vermutlich zwei Ursachen: Zum einen war der Fructose-Peak unvollständig vom Glucose-Peak getrennt. Zudem lag die Ketose in deutlich niedrigerer Konzentration vor als die Aldose, weshalb Fructose als Schulter des Glucose-Peaks erschien. Die hohen Werte für das I-FOS mit DP17 ließen sich durch eine höhere relative Variabilität bei der Peakintegration erklären, da sich die Peaks mit zunehmender Molekül-Länge verbreiterten und das I-FOS mit DP17 in einer sehr niedrigen Konzentration vorlag.

Das Packungsmaterial der in dieser Arbeit zunächst verwendeten HPLC-Säule war Silica-basiert. Silica-Packungsmaterial reagiert empfindlich auf hohe pH-Werte (Tanaka et al. 2003), weshalb diese HPLC-Säulen eine kurze Lebensdauer haben. Das führt dazu, dass die Retentionszeiten der Analyten mit zunehmender Anzahl der Analysen rasch abnehmen, einhergehend mit einem Verlust des Auflösungsvermögens. Basierend auf einer Dissertation (Hövels 2020) wurde aus diesem Grund die HPLC-Säule Eurospher II 100 NH2 (Knauer GmbH) nach der Analyse der ersten I-FOS-Produktion durch die HPLC-Säule Shodex Ashiapak NH2P-50 4E (Showa Denko K. K., Tokio, Japan) ersetzt. Diese Aminophasen-Säule besteht aus Polymer-basiertem Packungsmaterial aus Polyvinylalkohol, das chemisch stabiler ist als Silica. Deshalb zeichnet sich die Shodex Ashiapak-Säule im Vergleich zur Silica-basierten Säule durch äußerste Robustheit und Stabilität aus, wodurch sich die Nutzungsdauer deutlich verlängerte. Testmessungen zeigten, dass die Shodex Ashiapak Säule ebenso gute Ergebnisse wie die Silica-basierten Säule lieferte, weshalb die erstgenannte Säule als geeigneter für die Analyse der I-FOS eingestuft wurde.

Obwohl die Trennung von I-FOS bereits mit verschiedenen chromatographischen Verfahren durchgeführt wurde, bietet das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren Vorteile gegenüber bestehenden Trenntechniken. Ozimek et al. (2006b) entwickelten eine Methode zur Quantifizierung von Oligosacchariden auf der Grundlage von HPAEC in Kombination mit einem elektrochemischen Detektor (ED40; Dionex; Sunnyvale, US). In mehreren Studien wurde der von Ozimek und Kollegen beschriebene Aufbau für die chromatographische Analyse von FOS verwendet (Anwar et al. 2010; Ozimek et al. 2006a). Anwar et al. (2010) waren in der Lage, I-FOS bis zu einem DP von 20 in 40 Minuten im Gradientenelutionsmodus zu trennen. Zhou et al. (2022) verwendeten eine HPLC-Methode im Gradienten-Elutionsmodus in Zusammenhang mit einem

Verdampfungslichtstredetektor (ELSD) um I-FOS bis zu einem DP von 9 in unter 15 Minuten mit sehr guter Auflösung zu trennen. Hao et al. (2019) veröffentlichten eine Methode zur Trennung von Fructose, Glucose, Saccharose und mehreren I-FOS innerhalb von 10 Minuten unter Verwendung von Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) mit einem ELSD, ebenfalls in Verbindung mit Gradientenelution.

Obwohl die HPAEC/HPLC im Gradientenmodus den Nachweis eines breiten Spektrums von Produkten, z. B. von kleinen Zuckern und langkettigen FOS, ermöglicht, stellt diese Trennungstyp hohe Anforderungen an die Pumpenkonfiguration und die Detektionsmethode. Im Falle von UHPLC-Methoden werden Säulen und Partikelgrößen verwendet, die Gegendrucke erzeugen, die nicht mit HPLC-Pumpen kompatibel sind.

In der Literatur wurden auch isokratische Systeme für die Analyse von I-FOS verwendet. Das von Díez-Municio et al. (2013) verwendete isokratische HPLC-Setup ermöglichte die Abtrennung von I-FOS bis zu einem DP von 6. Allerdings waren sowohl die Messzeit als auch die Flussrate mit 68 Minuten bzw.  $1 \text{ ml min}^{-1}$  vergleichsweise hoch. Cassani et al. (2018) untersuchten den Gehalt an I-FOS in Erdbeersaft mittels isokratischer HPLC. Ihr Aufbau ermöglichte die Trennung einer kommerziellen I-FOS-Mischung (bis DP 8) in weniger als 12 Minuten. Andererseits bot der starke Kationenaustauschmechanismus der verwendeten Sugar-Pak I-Säule (Waters GmbH; Eschborn, Deutschland) keine ausreichende Auflösung von langkettigen FOS. Insgesamt haben viele isokratische Methoden den großen Nachteil, dass nur FOS mit niedrigem DP getrennt werden können.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit eine isokratische Methode entwickelt, die eine Peakkapazität nahe an Gradientensystemen aufweist und auch die Quantifizierung langkettiger DPs ermöglicht. Die Trennung von I-FOS von DP3 bis DP17 erfolgte in weniger als 45 Minuten, wobei eine hohe Auflösung der Analyten erzielt wurde. Bisher wurde keine isokratische Methode mit vergleichbaren Ergebnissen für kurz- und langkettige FOS veröffentlicht. Aufgrund des isokratischen Elutionsmodus kann diese Methode auf eine Vielzahl von HPLC-Systemen angewendet werden, ohne dass Gradienten- oder UHPLC-Komponenten erforderlich sind. Für Wissenschaftler, die an der isokratisch-chromatographischen FOS-Analyse interessiert sind, stellt die etablierte Methode deshalb eine nützliche Verbesserung gegenüber bestehenden isokratischen HPLC-Verfahren dar, da mittel- und langkettige FOS im Detail analysiert werden können.

### 4.2.3 Charakterisierung des InuGB-V3-Rohenzym

In einem vorläufigen Enzymassay mit aufgereinigter Inulosucrase wurde bestätigt, dass InuGB-V3 dazu geeignet ist I-FOS zu synthetisieren (Kapitel 3.2.2). Im Anschluss war es das Ziel, einen Prozess zur Produktion von I-FOS zu entwickeln, in dem Rohenzym als Biokatalysator verwendet werden sollte. Mit diesem Ziel wurden zunächst die grundlegenden Parameter des I-FOS-Produktionsprozesses optimiert, um die Transfruktosylierungsaktivität des InuGB-V3-Rohenzym und damit die Ausbeute des gewünschten Produkts zu erhöhen.

Hierbei wurde festgestellt, dass das InuGB-V3-Rohenzym ähnliche Eigenschaften wie andere Inulosucasen aufwies. Insbesondere zu den anderen in der Literatur beschriebenen Versionen der gleichen Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 (InuGB) besaß das InuGB-V3-Rohenzym hohe Ähnlichkeit. Die von den Autoren Anwar et al. (2010) und Díez-Municio et al. (2013) erstellten InuGB-Varianten lassen sich anhand der vorgenommenen Verkürzungen der Aminosäure-Sequenz von dem in dieser Arbeit verwendeten Enzym InuGB-V3 unterscheiden. Um die heterologe Proteinproduktion zu ermöglichen, wurde die Aminosäure-Sequenz von InuGB-V3 so verkürzt, dass die Motive zur Zellwandverankerung (einschließlich der PXX-Wiederholungen) die in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind, entfernt wurden. Auch die Signalsequenz, die sich am N-terminalen Ende des Proteins befindet, wurde eliminiert. Die N-terminale variable Region von InuGB-V3 blieb intakt, was das konstruierte Protein von den in der Literatur beschriebenen Versionen der gleichen Inulosucrase unterscheidet. Bei diesen Varianten ist der N-terminale variable Bereich deutlich verkürzt und Reste der PXX-Wiederholungen verbleiben am C-Terminus (Anwar et al. 2010; Díez-Municio et al. 2013; Ni et al. 2018; Wienberg et al. 2021).

Die Transfruktosylierungsaktivität von InuGB-V3-Rohenzym wurde durch die Zugabe von EDTA verringert, was bestätigte, dass die Aktivität von InuGB-V3 durch Calcium-Ionen und andere zweiwertige Kationen positiv beeinflusst wird, wie es für mehrere Inulosucasen und andere Fruktosyltransferasen gezeigt wurde (Anwar et al. 2010; Anwar et al. 2008; Ni et al. 2020; Ozimek et al. 2005).

Anwar et al. (2010) wiesen eine 30 %ige Reduktion der Aktivität der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 durch die Zugabe von EDTA nach. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Calcium-Ionen verhindert werden, was zeigte, dass EDTA die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom Enzym abhing (Anwar et al. 2010). Bei anderen Inulosucasen wurden durch die Zugabe von EDTA Aktivitäts-Abnahmen von bis zu 95 % beobachtet (Anwar et al. 2010; Anwar et al. 2008; Ni et al. 2020). Im Vergleich dazu war der negative Effekt von EDTA auf InuGB-V3-Rohenzym eher gering ( $14,7 \pm 3,7$  % Reduktion der Saccharose-Transfructosylierung). Außerdem zeigten die in der vorliegenden Arbeit

beschriebenen Ergebnisse, dass InuGB-V3 während der heterologen Produktion in *E. coli* BL21 ausreichend mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beladen wurde, da die Zugabe von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  die Saccharose-Umwandlung nicht verbesserte (Anwar et al. 2008). Ni et al. (2018) zeigten, dass ihre Variante der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 bei Supplementation mit  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen höhere Enzymaktivitäten aufwies als durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit kein verbesserter Effekt von  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen auf die Saccharose-Umsetzung durch InuGB-V3-Rohenzym beobachtet werden.

InuGB-V3-Rohenzym zeigte bei einem breiten pH-Spektrum (pH 3,5 - 6,0) eine schnelle Saccharose-Umsetzung, während bei niedrigeren pH-Werten eine verstärkte Saccharose-Hydrolyse beobachtet wurde. Ein pH-Optimum im leicht sauren bis neutralen Bereich wurde für viele Inulosucrasen aus Milchsäurebakterien (Anwar et al. 2010, Anwar et al. 2008; van Hijum et al. 2002; Ni et al. 2020, Ni et al. 2018; Olivares-Illana et al. 2002) sowie für Inulosucrasen aus *Streptomyces viridochromogenes* (Frasch et al. 2017), *Streptococcus mutans* (Heyer et al. 1998) und *Bacillus macerans* (Kim et al. 1998) gezeigt. Darüber hinaus wiesen Ni et al. (2018) für eine Variante der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 nach, dass bei pH-Werten unterhalb des Optimums die hydrolytische Aktivität des Enzyms anstieg.

Die Untersuchung der Saccharose-Umsetzung bei verschiedenen Temperaturen ergab eine optimale Saccharose-Transfruktosylierung bei 40 - 50 °C. Für andere Varianten der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 wurden Temperaturoptima von 55 °C (Anwar et al. 2010) und 35 °C (Ni et al. 2018) beschrieben. Für andere bakterielle Inulosucrasen wurde über eine optimale Aktivität bei hohen Temperaturen von 50 - 60 °C (van Hijum et al. 2002; Wada et al. 2003; Anwar et al. 2008; Kralj et al. 2018) sowie bei niedrigen Temperaturen von 30 - 45 °C (Heyer et al. 1998; Olivares-Illana et al. 2002; Ni et al. 2020) berichtet.

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte InuGB-V3-Rohenzym zeigte eine ausgezeichnete Aktivitätsstabilität über vier Tage bei 40 °C. Bei höheren Temperaturen nahm die Aktivität deutlich ab. Ähnlich hierzu zeigten Ni et al. (2018) einen negativen Effekt von 50 °C auf die Aktivität ihrer Variante der Inulosucrase aus *L. gasseri* DSM 20604 (84 % Restaktivität nach 180 min Inkubation). Im Gegensatz dazu wurde für die Inulosucrase aus *L. jensenii* eine höhere Temperaturstabilität festgestellt. Dieses Enzym behielt mehr als 75 % der Aktivität nach 10 Stunden Inkubation bei 50 -55 °C (Ni et al. 2020). In dieser Arbeit war auffallend, dass die Aktivität von InuGB-V3-Rohenzym bei 40 °C zwischen dem ersten und dem vierten Tag der Inkubation nur geringfügig abnahm. Vielmehr war die Aktivität bereits nach einem Tag Inkubation um  $9,0 \pm 6,8$  % reduziert (Kapitel 3.4.4). In ähnlicher Weise berichteten de Lima et al. (2021) bei der Untersuchung der



Temperaturstabilität einer Saccharose-6-Phosphat-Hydrolase aus *L. gasseri*, dass die Aktivität des Enzyms während der ersten 30 Minuten der Inkubation bei 40 °C schnell abnahm, dann aber für 48 Stunden stabil blieb (73 % Restaktivität).

Alle Aktivitätsbestimmungen von InuGB-V3 wurden unter optimierten Bedingungen mit 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose als Substrat durchgeführt. Die auf diese Weise bestimmte spezifische Aktivität der aufgereinigten Inulosucrase betrug 545 U mg Protein<sup>-1</sup> (Kapitel 3.1.2). Damit glich die spezifische Aktivität von InuGB-V3 der spezifischen Aktivität von 538 ± 6,4 U mg Protein<sup>-1</sup>, welche für die Inulosucrase-Variante InuGB-R aus *L. gasseri* DSM 20604 beschrieben wurde (Anwar et al. 2010). Vergleichbar hohe Aktivitäten wurden auch bei den Inulosucrasen aus *L. johnsonii* (719 U mg Protein<sup>-1</sup>, Anwar et al. 2008), *Paenibacillus macerans* (590 U mg Protein<sup>-1</sup>, Park et al. 2001), *L. gasseri* DSM 20243 (411 ± 17 U mg Protein<sup>-1</sup>, Anwar et al. 2010) und *L. jensenii* (ca. 380 U mg Protein<sup>-1</sup>, Ni et al. 2020) beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden für andere Inulosucrasen sehr viel niedrigere spezifische Gesamtaktivitäten zwischen 5,6 und 104 U mg Protein<sup>-1</sup> nachgewiesen (Frasch et al. 2017; Heyer et al. 1998; Kralj et al. 2018; Olivares-Illana et al. 2002; Wada et al. 2003; van Hijum et al. 2002).

#### 4.2.4 I-FOS Synthese unter Verwendung von InuGB-V3

Die Inulosucrase InuGB-V3 wurde in dieser Arbeit in mehreren I-FOS-Produktionen unter unterschiedlichen Bedingungen eingesetzt. Nach einem ersten Enzymassay mit aufgereinigter InuGB-V3 wurden Biokonversions-Reaktionen unter optimierten Prozessbedingungen mit InuGB-V3-Rohenzym durchgeführt. Dabei wurden zunächst 580 g L<sup>-1</sup> und schließlich eine gesteigerte Konzentration von 800 g L<sup>-1</sup> Saccharose zum Einsatz, um den Produktionsprozess zu optimieren.

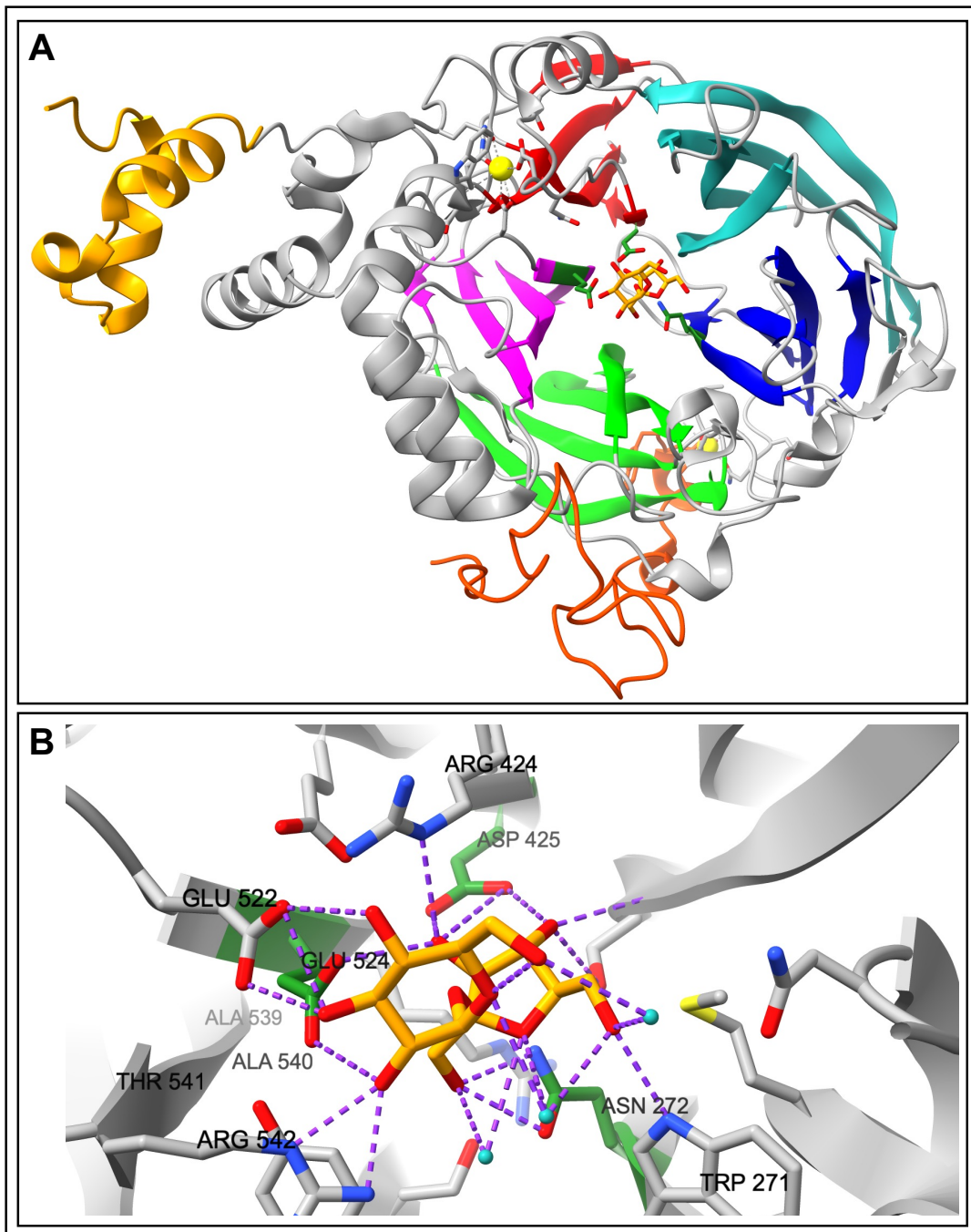
Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Kristallstruktur mehrerer Fructosyltransferasen entschlüsselt, darunter mehrere bakterielle Levansucrasen, die Inulosucrase aus dem halophilen Archaeon *Halalkalicoccus jeotgali* B3T, sowie die Inulosucrase aus *L. johnsonii* NCC 533 (InuJ, Abb. 36) (Ghauri et al. 2021; Pijning et al. 2011). Somit ist InuJ die einzige bakterielle Inulosucrase, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist. Allerdings weist die Aminosäuresequenz der Inulosucrase InuGB aus *L. gasseri* eine sehr hohe Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz von InuJ auf (Identität von 90 %, Ni et al. 2018).

Grundsätzlich sind sich die Strukturen der katalytischen Domäne der Fructosyltransferasen sehr ähnlich (Ghauri et al. 2021; Ni et al. 2019). Die katalytische Domäne von Fructosyltransferasen bildet eine fünfblättrige β-Propeller-Faltung, deren β-Faltblätter einen zentralen, trichterförmigen

Hohlraum für die Substratbindung umgeben (Abb. 36A). An dieser Stelle, dem aktiven Zentrum, erfolgt die Übertragung der Fructosyl-Gruppe. Dies wird durch drei katalytische Aminosäure-Reste koordiniert: einem Aspartat-, einem Asparagin-, sowie einem Glutamat-Rest, die als nukleophile Stabilisatoren des Übergangszustandes bzw. als allgemeine Säure/Base fungieren (Abb. 36B; Ni et al. 2019; Pijning et al. 2011).

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen der Inulosucrasen aus *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. citreum* und *Weissella confusa* wurde gezeigt, dass die Sequenzen der  $\beta$ -Faltblätter, die den  $\beta$ -Propeller bilden, hoch konserviert sind, während die katalytischen Aminosäure-Reste identisch sind. Sequenzvariationen finden sich hauptsächlich in den Schleifen, die die  $\beta$ -Faltblätter des  $\beta$ -Propellers verbinden, sowie in den N-terminalen und C-terminalen Domänen (Ni et al. 2018).

Der Reaktionsmechanismus von Fructosyltransferasen entspricht einer Doppel-Verdrängungsreaktion und erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst wird die glycosidische Bindung des Fructosyl-Donors (i. d. R. Saccharose) gespalten, was zur kovalenten Bindung der Fructosyl-Einheit an das Enzym und zur Freisetzung des Glucose-Anteils der Saccharose führt. Anschließend wird die Fructosyl-Gruppe vom Enzym auf ein Akzeptor-Molekül übertragen, wodurch der Akzeptor um eine Fructosyl-Einheit verlängert wird. Die  $\beta$ -Konfiguration des  $\beta$ -Fructofuranosyls wird dabei durch zwei aufeinanderfolgende Inversionen erhalten (Meng und Fütterer 2003; Ni et al. 2019; Ozimek et al. 2006b; Pijning et al. 2011). Die Donor- und Akzeptor-Substrate werden über Wasserstoffbrückenbindungen an das Enzym gebunden, wobei insbesondere die direkt vor dem aktiven Zentrum liegenden, als +1 und +2 *subsites* bezeichneten Proteinstellen untersucht wurden (Ni et al. 2019). Darüber hinaus werden die wachsenden Fructan-Ketten in einer „Bindungsspur“ vom Protein fixiert (Charoenwongpaiboon et al. 2019). Die Stabilisierung des Akzeptors am Protein beeinflusst den maximal möglichen DP der Produkte und unterstützt die prozessive Polymerisierung des Akzeptors (Charoenwongpaiboon et al. 2019; He et al. 2018; Homann et al. 2007; Ozimek et al. 2006a; Ozimek et al. 2006b; Strube et al. 2011). Wie viele Fructosyltransferasen aus Gram-positiven Bakterien weisen auch die Inulosucrasen InuGB und InuJ Bindestellen für Calcium-Ionen auf (Abb. 36A; Anwar et al. 2010; Pijning et al. 2011). Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle ( $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle I, Abb. 38A, Schleifenregion zwischen  $\beta$ -Propeller-Blatt 3 und 4) befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums. Die hochkonservierten Aminosäure-Reste, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle umgeben, bilden ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen aus, an dem auch Aminosäurereste beteiligt sind, die in unmittelbarer Nähe zur +1 *subsite* liegen. Zum Beispiel bildet Arg424 eine Wasserstoffbrückenbindung zum Calcium-Ion sowie eine Ionische-Bindung zu der allgemeinen Säure/Base Glu524. Es wird angenommen, dass die Calcium-



**Abb. 36. Kristallstruktur der Inulosucrase aus *L. johnsonii* (InuJ) im Komplex mit Saccharose (PDB ID: 2yfs).** InuJ ist zurzeit die einzige bakterielle Inulosucrase, deren Kristallstruktur entschlüsselt ist (Pijning et al. 2011). **(A)** Ansicht von oben auf die Gesamtstruktur von InuJ im Bändermodell. Die drei katalytischen Aminosäure-Reste (Glu522, Asn272, Arg424, dunkel-grün), die Aminosäure-Reste der Calcium-Bindestellen sowie die Saccharose sind im Stab-Modell gezeigt. Der von der katalytischen Domäne gebildete fünfblättrige  $\beta$ -Propeller ist durch die blaue (Blatt 1), türkise (Blatt 2), rote (Blatt 3), pinke (Blatt 4) bzw. grüne (Blatt 5) Färbung der entsprechenden  $\beta$ -Faltblätter hervorgehoben. N-terminale Domäne (AS 176 – 209): gelb. C-terminale Domäne (AS 663 – 708): orange. Calcium-Ionen: hell-gelbe Kugeln. Gestrichelte Linien (grau) stellen Protein-Metall-Wechselwirkungen dar. **(B)** Ansicht von oben auf das aktive Zentrum von InuJ. Saccharose: orange. Die Aminosäure-Reste des Aktiven Zentrums (max. 5 Å vom Substrat entfernt) sind im Stab-Modell gezeigt. Gestrichelte Linien (lila) weisen auf Wasserstoffbrücken- und Ionische-Bindungen hin. Katalytischen Aminosäure-Reste: dunkel-grün. Die Protein-Strukturen wurden mit dem Programm ChimeraX visualisiert.

Ionen die Proteinstruktur im angrenzenden Bereich stabilisieren und auch die Bindung von Substrat-Molekülen beeinflussen (Meng und Fütterer 2003; Pijning et al. 2011). Tatsächlich haben experimentelle Untersuchungen gezeigt, dass die die Aktivität und Temperaturstabilität der Fructosyltransferasen durch die Calcium-Ionen verstärkt werden können (Anwar et al. 2010, Anwar et al. 2008; Ni et al. 2020; Ni et al. 2018; Ortiz-Soto et al. 2004). Eine Mutationsstudie an der Inulosucrase aus *L. reuteri* 121 zeigte, dass der Austausch der Aminosäurereste in der Ca<sup>2+</sup>-Bindestelle I die Kettenlänge der synthetisierten I-FOS moduliert (Charoenwongpaiboon et al. 2020).

Bei der Polymerisierungsreaktion der Inulosucrasen entsteht hochpolymeres Inulin. Eine Besonderheit bakteriellen Inulins ist der Umstand, dass die Verbindung sehr hohe DPs zwischen 10.000 und  $\geq 100.000$  annehmen kann und damit Molekulargewichte von  $10^6 - 10^7$  Da besitzt (Ni et al., 2019; Shoab et al., 2016). Darin unterscheidet sich bakterielles Inulin von pflanzlichem, welches selten einen DP > 60 erreicht und abhängig von der Polydispersität in etwa ein Molekulargewicht  $10^3$  Da aufweist (Meyer et al., 2015). Das Produktspektrum bakterieller Inulosucrasen umfasst neben hochmolekularem Inulin jedoch auch Inulin mittlerer Kettenlänge und I-FOS. Einige Inulosucrasen produzieren ausschließlich I-FOS, Inulin mittlerer Kettenlänge oder hochmolekulares Inulin. Inulin-synthetisierende Inulosucrasen sind aus *L. jensenii* (Ni et al. 2020) und einigen *Streptococcus mutans*-Stämmen (Ebisu et al. 1975; Aduse-Opuko et al. 1989; Rosell und Birkhed 1974) bekannt. Die ausschließliche Produktion von I-FOS oder langkettigen I-FOS wurde für Inulosucrasen aus *Paenibacillus macerans* (Kim et al. 1998; Park et al. 2001), *L. reuteri* TMW1.106 (Schwab und Gänzle 2006) und *Bacillus agaradhaerens* (Inulosucrase Fosa, Kralj et al. 2018) beschrieben. Die meisten der bisher untersuchten Inulosucrasen produzieren jedoch eine Mischung aus hochmolekularem Inulin, langkettigen I-FOS und I-FOS (Anwar et al. 2008; Anwar et al. 2010; Kralj et al. 2018; Peña-Cardena et al. 2015; Heyer et al. 1998; Frsch et al. 2017; van Hijum et al. 2002; Wada et al. 2003).

Auch das in dieser Arbeit untersuchte Enzym InuGB-V3 produzierte unter allen getesteten Bedingungen eine Mischung aus I-FOS des GFn-Typs und Inulin mit höherem Molekulargewicht (Kapitel 3.2.2 und 3.5). Ein weiteres Syntheseprodukt, das nicht dem Elutionsmuster der I-FOS des GFn-Typs folgte, eluierte zwischen Saccharose und 1-Kestotriose. Dabei handelte es sich höchstwahrscheinlich um ein Trisaccharid-Isomer von 1-Kestotriose, wie z. B. Neo-Kestotriose oder möglicherweise das Disaccharid Inulobiose (Díez-Municio et al. 2013). Produkte mit ähnlichen Elutions-Eigenschaften sind auch für andere Inulosucrasen beschrieben worden (Anwar et al. 2008; Ozimek et al. 2006b). Dieses unbekanntes Produkt wurde jedoch nur in geringen

Mengen synthetisiert (max.  $3 \text{ g L}^{-1}$  in der finalen Biokonversion aus  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, Kapitel 3.5.2).

Unter verschiedenen Reaktions-Bedingungen wurden I-FOS des GFn-Typs mit einem DP von 3 – 17 nachgewiesen. Bereits unter nicht-optimalen Bedingungen stellten die I-FOS das Hauptprodukt des Enzyms dar, sodass sich InuGB-V3 als geeignet zur I-FOS-Produktion erwies. Die Bildung der Produkte durch InuGB-V3 im Reaktionsverlauf ähnelte sich in allen Enzym-Assays. Die Produktbildung steht im Einklang mit dem vorgeschlagenen nicht-prozessiven Reaktionsmechanismus von Fructosyltransferasen, bei dem die FOS nach jedem Verlängerungsschritt aus dem Enzym freigesetzt werden und als Zwischenprodukte in der Reaktion auftreten (Ozimek et al. 2006b; Raga-Carbajal et al. 2018). Dadurch geht die Verlängerung der primären Zwischenprodukte 1-Kestotriose und 1,1-Kestotetraose mit der beobachteten Abnahme ihrer Konzentration und dem Auftreten von längerem I-FOS einher (Raga-Carbajal et al. 2018).

Durch die Anwendung gesteigerter Substrat-Konzentrationen ( $345 - 800 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde die Saccharose-Hydrolyse durch InuGB-V3-Rohenzym verringert, während sich das Produktprofil in Richtung der Transfructosylierungs-Produkte mit niedrigerem DP verschob (Kapitel 3.5). Dadurch konnte sowohl die Konzentration als auch der Ertrag von I-FOS maßgeblich verbessert werden (Kapitel 3.5). Ähnliche Effekte wurden auch bei anderen Inulosucrasen beobachtet. Bei höheren Saccharose-Konzentrationen wurden bei Verwendung der Inulosucrasen aus *L. citreum* (Peña-Cardeña et al. 2015) und *L. reuteri* (Ozimek et al. 2006b; van Hijum et al. 2002) weniger polymeres Inulin und mehr I-FOS synthetisiert. Außerdem wurde für mehrere Inulosucrasen gezeigt, dass ihre hydrolytische Aktivität mit steigenden Saccharose-Konzentrationen abnimmt (Ni et al. 2019).

Ein weiterer Vorteil der erhöhten Substratkonzentration ist, dass die Gesamt- und Transfructosylierungs-Aktivität einiger Inulosucrasen, einschließlich der Inulosucrase aus *L. gasseri*, mit der Saccharose-Konzentration zunimmt (van Hijum et al. 2003). Tatsächlich zeigte sich bei der Untersuchung der kinetischen Parameter der Inulosucrasen aus *L. gasseri* (InuGB-R, Anwar et al. 2010), *L. johnsonii* (Anwar et al. 2008), *L. reuteri* (Charoenwongpaiboon et al. 2019; van Hijum et al. 2003) und *Bacillus agaradhaerens* (Kralj et al. 2018), dass die Transfructosylierungs- und die Gesamtaktivität nicht mit der typischen Michaelis-Menten-Kinetik (Sättigungskurve) beschrieben werden konnten, sondern besser durch die Hill-Gleichung (sigmoidale Kurve) charakterisiert wurden. Dies lag zum einen darin begründet, dass bei zunehmender Saccharose-Konzentration ein initialer exponentieller Zuwachs in der Reaktions-Rate beobachtet wurde. Zudem wurde bei den in den Studien typischerweise verwendeten Saccharose-Konzentrationen von  $\leq 1 \text{ M}$  keine Enzym-Sättigung zu beobachten (Anwar et al. 2008;

2010; Kralj et al. 2018; van Hijum et al. 2003). Erst bei äußerst hohen Substrat-Konzentrationen zeigt sich bei Enzymen, die durch die Hill-Gleichung beschrieben werden, eine Annäherung an die Enzym-Sättigung (Versluys et al. 2022). Die Hill-Gleichung wird typischerweise für Enzyme verwendet, bei denen die Substratbindung durch bereits gebundenes Substrat verstärkt wird (Anwar et al. 2008). Die Autoren Anwar et al. (2008) vermuteten, dass das von der Hill-Gleichung beschriebene Verhalten bei Inulosucrasen darauf zurückzuführen ist, dass sowohl Saccharose als auch die in der Anfangsphase der Reaktion gebildeten I-FOS besser als Akzeptoren geeignet sind als wachsende Polysaccharid-Ketten.

In der finalen Biokonversions-Reaktion mit InuGB-V3-Rohenzym unter optimierten Bedingungen und der hohen Saccharose-Konzentration von  $800 \text{ g L}^{-1}$  konnte in dieser Arbeit eine I-FOS-Konzentration von  $401 \text{ g L}^{-1}$  und eine Ausbeute von  $0,50 \text{ g I-FOS pro g eingesetzter Saccharose}$  erreicht werden. Diese Ergebnisse übertreffen die I-FOS-Konzentrationen und -Ausbeuten von publizierten I-FOS-Produktionen, die mit anderen Varianten von InuGB sowie anderen bakteriellen Inulosucrasen durchgeführt wurden (Tabelle 25). In ihrer ersten Beschreibung der Inulosucrase InuGB konnten Anwar et al. (2010) in 7 Tagen  $49 \pm 3,3 \text{ g L}^{-1}$  I-FOS sowie  $20 \pm 1,8 \text{ g L}^{-1}$  polymeres Inulin produzieren. Durch die Optimierung der Produktionsbedingungen erreichten Díez-Municio et al. (2013) einen Ertrag von  $135 \text{ g L}^{-1}$  I-FOS. Durch die Konstruktion einer rekombinanten Hefe, die die Inulosucrase aus *L. reuteri* sezernierte, konnten  $152,6 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$  I-FOS aus  $400 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in einem fermentativen Prozess synthetisiert werden (Ko et al. 2019). Unter Verwendung der Inulosucrasen aus *Paenibacillus macerans* (Kim et al. 1998) und *L. citreum* (Peña-Cardeña et al. 2015) wurden  $211,5 \text{ g L}^{-1}$  (aus  $500 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) bzw.  $196,74 \text{ g L}^{-1}$  I-FOS (aus  $700 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) produziert. Soweit bekannt ist, wurden mit bakteriellen Inulosucrasen keine höheren I-FOS-Konzentrationen als  $307 \text{ g L}^{-1}$  (Ni et al. 2022) und keine höheren I-FOS-Ausbeuten als  $0,45 \text{ g pro g Substrat}$  (Díez-Municio et al. 2013) erzielt. Industriell werden bakterielle Inulosucrasen zurzeit nicht eingesetzt.

Im industriellen Maßstab werden scFOS (Mischung aus kurzkettigen FOS, hauptsächlich I-FOS GF2 – GF4, auch I-FOS des Fn-Typs, L-FOS und neo-FOS) aus konzentrierten Saccharose-Lösungen mit Hilfe pilzlicher Enzyme aus *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* oder *Aureobasidium pullulans* hergestellt (Meyer et al. 2015). Damit werden Produkt-Ausbeuten von 55 - 60 % erzielt (Meyer et al. 2015; Yun 1996). Die ersten auf diese Weise hergestellten scFOS, vermarktet als Neo-Sugar, wurden 1984 von Meiji Seika Co. (Japan) auf den Markt gebracht (Yun 1996). Weitere Unternehmen zogen mit eigenen Produktions-Strategien nach, sodass aktuell diverse scFOS-Präparationen von verschiedenen Herstellern erhältlich sind, darunter Actilight® und Profeed®

(Beghin-Meiji Industries, France), Oligo-Sugar (Cheil Foods and Chemicals Inc., Korea), NutraFlora® (GTC Nutrition, USA), Meioligo® (Meiji Seika Kaisha Ltd., Japan) und Beneshine™ P-type (Victory Biology Engineering Co., Ltd., China) (Dominguez et al. 2014). Zudem werden kontinuierlich neue pilzliche Enzyme sowie alternative Produktions-Verfahren zur scFOS-Synthese erforscht, um die aktuellen Produktions-Strategien zu verbessern. In vielen neueren Studien werden beispielsweise Pilzmyzelien in Feststoff-Bioreaktoren (*solid-state fermentation*) mit Saccharose-haltigen Abfallprodukten als Substratquelle genutzt. Aber auch reine Saccharose kommt in neueren Prozessen weiterhin zum Einsatz (Nobre et al. 2022).

Mit scFOS-produzierenden Enzymen fungalen Ursprungs konnten I-FOS-Endkonzentrationen erzielt werden, die mit den Ergebnissen von InuGB-V3-Rohenzym vergleichbar sind (Tabelle 25). Beispielsweise wurden ca. 400 g L<sup>-1</sup> scFOS aus 650 g L<sup>-1</sup> Saccharose mit immobilisierten Myzelien von *Aspergillus japonicus* (Cruz et al. 1998) bzw. aus 700 g L<sup>-1</sup> Saccharose mit ganzen Zellen von *Penicillium citrinum* (Hayashi et al. 2000) gewonnen. Ein typisches Merkmal der FOS-Produktion auf der Basis von Pilzenzymen sind vergleichsweise hohe FOS-Ausbeuten, die Werte von über 0,6 g scFOS pro g Saccharose erreichen können (Nishizawa et al. 2001; Nobre et al. 2022; Sangeetha et al. 2005; Yun 1996). Diese Erträge sind auf den hohen Anteil an scFOS mit geringer Kettenlänge zurückzuführen, die große Mengen an Glucose enthalten. Bei einer hypothetischen 100 %igen Umsetzung der Saccharose zu 1-Kestotriose (GF2) und Glucose als einzigen Produkten, wäre eine theoretische Ausbeute von 75 % möglich (Yoshikawa et al. 2008).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass InuGB-V3-Rohenzym sehr effizient bei der Erzeugung eines Produktgemischs war, das aus großen Mengen an kurzkettigen I-FOS, aber auch I-FOS mit höherem DP (bis zu DP11) bestand. Da I-FOS mit höherem DP einen geringeren Anteil an Glucose beinhalten, wurden mit diesem Produktgemisch im Vergleich zu Verfahren mit Pilzenzymen etwas geringere Ausbeuten erzielt. Die Biokonversion von Saccharose zu scFOS mit fungalen Enzymen wurde jedoch mit sehr großen Mengen an Zellmasse im Verhältnis zur verwendeten Saccharose-Menge durchgeführt (10 - 100 g Saccharose pro g Zellen), was Fragen zur wirtschaftlichen Durchführbarkeit der Prozesse und zur Abfallentsorgung aufwirft. Darüber hinaus könnte die starke Verunreinigung mit Zellen und Zellbestandteilen aus lysierten Pilzzellen und deren Abtrennung von den scFOS-Zubereitungen die Kostenbilanz des Prozesses erheblich beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu konnten in unserer Arbeit aufgrund des effizienten Überexpressionssystems in *E. coli* fast 2 kg Saccharose mit 1 g Zellen umgesetzt werden.

Tabelle 25 Beispiele der Produktion von I-FOS und scFOS mit bakteriellen und fungalen Enzymen.

Ursprungs-Organismus	Produktionsstrategie	Saccharose-Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	FOS-Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	FOS-Ausbeute [g FOS g Saccharose <sup>-1</sup> ] <sup>a)</sup>	Produktions-Effizienz [g Saccharose g Zellen <sup>-1</sup> ]	Referenz
<b>Bakterielle Enzyme</b>						
<i>L. gasseri</i>	Rohenzym	800	401 ± 7	0,50 ± 0,1	1984 <sup>e)</sup>	Diese Arbeit
<i>L. gasseri</i>	Aufgereinigtes Enzym	300	135 <sup>c)</sup>	0,45	n. a.	(Díez-Municio et al. 2013)
<i>L. reuteri</i>	Aufgereinigtes Enzym	700	307	0,44 <sup>c)</sup>	n. a.	(Ni et al. 2022)
<i>Bacillus macerans</i>	Rohenzym	500	212 <sup>c)</sup>	0,42		(Kim et al. 1998)
<i>L. gasseri</i>	Aufgereinigtes Enzym	345	146 ± 7	0,42 ± 0,02	148 <sup>e)</sup>	Diese Arbeit
<i>L. reuteri</i>	Fermentation mit rekombinanter Hefe	400	153 ± 1	0,38 <sup>c)</sup>	40 <sup>f)</sup>	(Ko et al. 2019)
<i>Leuconostoc citreum</i>	Aufgereinigtes Enzym	700 <sup>c)</sup>	225 <sup>c)</sup>	0,32 <sup>c)</sup>	n. a.	(Peña-Cardena et al. 2015)
<b>Fungale Enzyme</b>						
<i>Penicillium citrinum</i>	Ganze Zellen	700	399 <sup>c)</sup>	0,57 <sup>b)d)</sup>	99 <sup>e)</sup>	(Hayashi et al. 2000)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Immobilisierte Zellen	650	397 <sup>c)</sup>	0,61 <sup>b)d)</sup>	11 <sup>e)</sup>	(Cruz et al. 1998)
<i>Penicillium citreonigrum</i>	Fermentation mit ganzen Zellen	200	126	0,65 ± 0,06 <sup>d)</sup>	n. a.	(Nobre et al. 2019)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Fermentation mit immobilisierten Zellen	165	116	0,69 <sup>d)</sup>	9,4 <sup>f)</sup>	(Mussatto et al. 2009)

<sup>a)</sup>Basierend auf der initialen Menge an Saccharose [w/w].

<sup>b)</sup>Basierend auf den gesamten Sacchariden [w/w].

<sup>c)</sup>Anhand der von den Autoren angegebenen Werten.

<sup>d)</sup>Werte basieren auf der Produktion von scFOS mit hohem Glucosegehalt.

<sup>e)</sup>Bio-Feuchtmasse der Zellen/Mycelien

<sup>f)</sup>Trockengewicht der Zellen/Mycelien



#### 4.2.5 Aufreinigung der produzierten I-FOS

Grundsätzlich verbleiben bei der enzymatischen Herstellung von I-FOS/scFOS große Mengen an Glucose, etwas Fructose und nicht-umgesetzte Saccharose im Produktsirup (Martins et al. 2019). Sofern keine Aufreinigungs-Verfahren zur Abtrennung der Zucker angewendet werden, liegt die Reinheit von I-FOS/scFOS daher in der Regel bei 50-65 %, (Yun 1996; Nishizawa et al. 2001; Sangeetha et al. 2005; Nobre et al. 2022). Solche heterogenen I-FOS/scFOS-Sirupe mit einer Reinheit von 55-60 %, wie beispielsweise Actilight® (Beghin Meiji), werden zur Anwendung im Lebensmittelsektor im Handel vertrieben (Kruschitz und Nidetzky 2020; Nishizawa et al. 2001; Nobre et al. 2015a). Mit einer I-FOS-Reinheit von mehr als 53 % war der mit InuGB-V3-Rohenzym erzeugte I-FOS-reiche Sirup bereits vergleichbar zu diesen kommerziell erhältlichen I-FOS-Präparaten. Hohe Konzentrationen von hochkalorischen Mono- und Disacchariden im Produktsirup wirken sich jedoch negativ auf die menschliche Gesundheit aus, verringern den präbiotischen Wert des Produkts und reduzieren somit die Anwendbarkeit der Zuckermischung in gesunden, Diät- und Diabetiker-Lebensmitteln (Martins et al. 2019; Nobre et al. 2015b). Insbesondere I-FOS-Produkte für den pharmazeutischen Markt benötigen eine sehr hohe Reinheit. Kommerzielle I-FOS-Produkte mit einer Reinheit von > 90 % sind jedoch selten, da die Aufreinigung komplex und sehr kostenintensiv ist (Kruschitz und Nidedetzky 2020). Abgesehen von der optionalen Abtrennung von unerwünschten Zuckern, umfasst das *Downstream Processing* von I-FOS-Reaktionslösungen die Trennung der Saccharide von enthaltenen Nicht-Sacchariden wie beispielsweise dem Biokatalysator, Puffern, Salzen, und restlichen Medien-Bestandteilen (bei fermentativen Produktions-Methoden). Oftmals werden ein Ultrafiltrations-Schritt sowie ein Adsorptionschromatographie-Schritt mit Aktivkohle durchgeführt, um den Biokatalysator zu entfernen und die Reaktionslösung zu entfärben. Des Weiteren werden die gereinigten I-FOS-Lösungen i. d. R. durch Evaporation aufkonzentriert (Kruschitz und Nidedetzky 2020).

##### 4.2.5.1 Literaturangaben zur Aufreinigung von I-FOS

Die Abtrennung der gewünschten I-FOS von den unerwünschten Zuckern ist sehr herausfordernd, da die verschiedenen Saccharide eine hohe strukturelle und physikochemische Ähnlichkeit zueinander haben (Kruschitz und Nidedetzky 2020). In der Literatur sind verschiedene Methoden zur selektiven Reinigung von I-FOS/scFOS und anderen komplexen Kohlenhydraten aus heterogenen Prozesslösungen beschrieben. Insbesondere Nanofiltration, Kationen-Austausch-Chromatographie und andere chromatographische Methoden sowie selektive Fermentation kommen zum Einsatz (Kruschitz und Nidedetzky 2020).

Durch eine mikrobielle Behandlung der Prozesslösungen werden enthaltene Monosaccharide während eines gleichzeitig oder auf die FOS-Produktion folgenden Fermentationsprozesses durch Mikroorganismen wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* und *Zymomonas mobilis* selektiv verbraucht (Nobre et al. 2015b; Nobre et al. 2022). Das Verfahren nutzt aus, dass viele Mikroorganismen sowohl Glucose und Fructose als auch Saccharose metabolisieren können, Oligosaccharide jedoch nicht (Kruschitz und Nidedetzky 2020).

*Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, Fructose, Glucose und Saccharose zu metabolisieren (Yoon et al. 2003). In einer auf die scFOS-Produktion folgenden mikrobiellen Behandlung der Prozesslösung mit *Saccharomyces cerevisiae* steigerten Nobre et al. (2016) die Reinheit einer scFOS-Lösung auf 82 %. Zeng et al. (2022) erzielten eine scFOS-Reinheit von 95 %, indem die Autoren die mit Fructofuranosidase produzierte scFOS-Lösung mit der Hefe *Wickerhamomyces anomalus* behandelten, die Fructose, Glucose und Saccharose fermentierte. Mit immobilisierten Zellen von *Zymomonas mobilis* konnten Crittenden und Playne (2002) Glucose, Fructose und Saccharose vollständig aus I-FOS und scFOS-Lösungen entfernen. Die Fermentationsendprodukte waren Ethanol, CO<sub>2</sub> und Sorbitol (Crittenden und Playne 2002).

Durch mikrobielle Behandlung konnten, bezogen auf den Saccharid-Gehalt, hohe Reinheiten erzielt werden (Crittenden und Playne 2002; Zeng et al. 2022). Die Nachteile der mikrobiellen Aufreinigung sind die kostenintensive Herstellung der Mikroorganismen und die zusätzlich erforderlichen Schritte im *Downstream Processing*, um die genutzten Mikroorganismen und die aus der Fermentation resultierenden Stoffwechselprodukte (z. B. Ethanol, Säuren, Glycerin) sowie Medienbestandteile aus der Prozesslösung zu entfernen (Kruschitz und Nidedetzky 2020; Nobre et al. 2015b).

Membrantechnologien, wie Ultra- und Nanofiltration, gelten als am besten durchzuführenden Methoden zum *Downstream Processing* von Kohlenhydraten (Pinelo et al. 2009). Nanofiltration ist ein druckbetriebenes Membranverfahren, das zur selektiven Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen und mehrwertigen Ionen aus Prozessströmen genutzt wird. Der Trennmechanismus basiert auf dem Rückhaltepotenzial einer semipermeablen Membran, wodurch Kohlenhydrate aufgrund ihrer ungeladenen Natur durch Größenausschluss getrennt werden. Die Wahl der Trenngrenze der Filtrationsmembran beeinflusst, welche Solute zurückgehalten werden (Kruschitz und Nidetzky 2020). Bei der Ultrafiltration kommen Membranen mit größeren Porendurchmessern zum Einsatz, um makromolekulare Verbindungen zurückzuhalten (Pinelo et al. 2009). Nanofiltration zeichnet sich durch einen geringen Energie- und Lösungsmittelverbrauch aus und ist für hochskalierte Zwecke geeignet. Allerdings können die verschiedenen Komponenten der Reaktionslösung nicht in einem Schritt abgetrennt werden

(Kruschitz und Nidetzky 2020). Es ist nicht möglich, gleichzeitig Oligosaccharide vollständig zurückgehalten und Mono- und Disaccharide abzutrennen, sodass auch bei der Nanofiltration ein Konflikt zwischen Reinheit und Ausbeute besteht (Kovács et al. 2014). Die Anwendung von Diafiltration, bei der der *Feed*-Lösung zusätzliches Lösungsmittel zugegeben wird, kann die Aufreinigung von Oligosacchariden verbessern (Kovács et al. 2014). Beispielsweise konnten Kuhn et al. (2010) die Reinheit einer scFOS-Lösung von 55 auf 90 % erhöhen, indem eine Diafiltration gefolgt von einer Nanofiltration durchgeführt wurde.

Häufig werden präparative Chromatographie-Methoden zur Aufreinigung von komplexen Kohlenhydraten verwendet, darunter Kationen-Austausch-, Größenausschluss-, Zeolith-basierte-, Verteilungs- und Adsorptions-Chromatographie. Mit chromatographischen Verfahren kann eine sehr hohe Reinheit erzielt werden, allerdings haben chromatographische Methoden zumeist eine geringe Produktkapazität ( $\leq 10 \text{ g}_{\text{Produkt}} \text{ kg}_{\text{Resin}}^{-1}$ ) und einen hohen Energiebedarf (Kruschitz und Nidetzky 2020).

Bei der Kationen-Austausch-Chromatographie beruht der Trennmechanismus vornehmlich auf elektrostatischen Interaktionen zwischen den Analyten und kationischen Gruppen (i. d. R. Metallionen) der stationären Phase (Kruschitz und Nidetzky 2020). Durch die Verwendung einer Säule mit Calcium-Ionen beschichtetem Kunstharz konnten (Nobre et al. 2014) die Reinheit von scFOS von 50 auf 90 % erhöhen. Kationen-Austausch-Chromatographie verbraucht jedoch große Mengen Elutionsmittel und sollte bei hohen Temperaturen durchgeführt werden (bis 80 °C). Diese Faktoren führen zu höheren Prozesskosten (Kruschitz und Nidetzky 2020) und bergen das Risiko der Oligosaccharid-Hydrolyse (Antošová et al. 1999).

In der Industrie wird zur Aufreinigung von FOS und GOS vornehmlich die Methode der *Simulated Moving Bed Chromatography* (SMBC) angewandt (Kruschitz und Nidetzky 2020; Kovács et al. 2014). Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von SMBC durch Meiji Seika (Japan) zur Herstellung des hochreinen (95 %) scFOS-Produkts Neosugar P (Kovács et al. 2014). Wiśniewski et al. (2013) konnten mit Kationen-Austausch-Chromatographie im SMB-Verfahren die Reinheit von GOS von 59 % auf 99,9 % erhöhen, indem Glucose, Lactose und Galactose abtrennt wurden. SMBC ist eine kontinuierliche Chromatographie-Methode bei der binäre Stoffgemische durch einen simulierten Gegenstrom zwischen stationärer und mobiler Phase getrennt werden. Mehrere Chromatographie-Säulen werden hintereinandergeschaltet und durch die Positionierung von zwei Einlässen (für *Feed* und *Eluent*) und zwei Auslässen (Extrakt und Raffinat) innerhalb des Chromatographie-Rings werden vier Trennzonen definiert. Durch kontinuierliches Zuführen der Probe (*Feed*) und des Lösungsmittels (*Eluent*), Abführen des Raffinats und Extrakts sowie durch synchrones Umschalten der Einlässe und Auslässe entgegen der Flussrichtung des Eluenten wird

ein Gegenstrom zwischen der stationären und der mobilen Phase erreicht, was zu einer hohen Reinheit beider Zielfractionen führt (Kruschitz und Nidetzky 2020). SMBC ermöglicht die Herstellung von hochreinen ( $\geq 95\%$ ) Produkten, die Betriebsweise spart Elutionsmittel und die Produkt-Lösungen müssen nicht so stark aufkonzentriert werden wie bei anderen Methoden. Allerdings ist der Aufbau, Betrieb, Optimierung und die Kontrolle des Prozesses sehr komplex (Nobre et al. 2015b). Zudem sind die Geräte sehr kostenintensiv, weshalb SMBC nur bei sehr umfangreichen großtechnischen Prozessen wirtschaftlich sinnvoll ist (Aburto et al. 2018; Nobre et al. 2014; Schlinge et al. 2010).

Ein weiterer viel verwendeter Ansatz für die selektive Aufreinigung von I-FOS aus heterogenen Prozesslösungen ist die Adsorptions-Chromatographie mit Aktivkohle (Nobre et al. 2015b; Martins et al. 2019). Aktivkohle ist kostengünstig und kann einfach regeneriert werden (Kruschitz und Nidetzky 2020). Das Material hat aufgrund des Porenvolumens und der großen Oberfläche ( $\sim 1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) eine gute Sorptionskapazität und ermöglicht schnelle, einfache und kostengünstige Reinigungsprozesse (Kuhn et al. 2014; Nobre et al. 2012). Eine rentable industrielle Anwendung ist somit möglich (Kruschitz und Nidetzky 2020). Die Adsorption der Analyten an die Aktivkohle ist komplex und beruht auf van der Waals Kräften, induzierten dipolaren Interaktionen sowie hydrophilen und hydrophoben Interaktionen (Kruschitz und Nidetzky 2020). Die Adsorptionsaffinität von Sacchariden nimmt im Allgemeinen mit steigendem Molekulargewicht zu, da größere Saccharide aufgrund der höheren Anzahl an CH-Gruppen hydrophober sind (Nobre et al. 2012). Deshalb weisen I-FOS hervorragende Adsorptionseigenschaften gegenüber Aktivkohle auf, wohingegen Mono- und Disaccharide eine schwächere Affinität haben. Mono- und Disaccharide können aus diesem Grund mit Wasser und niedrig konzentrierten Ethanol-Lösungen effizient von der Aktivkohle eluiert werden, ohne dass die gebundenen I-FOS signifikant verloren gehen (Boon et al. 2000; Campos et al. 2017; Hidaka et al. 1988; Nobre et al. 2012). In beschriebenen Arbeiten zur Aufreinigung von I-FOS/scFOS wurden zumeist Festbettsäulen mit Aktivkohle als Packmaterial verwendet. Diese Säulen wurden entweder schrittweise mit Wasser und unterschiedlichen Ethanol-Konzentration oder mit einem Ethanol-Gradienten gespült, um die Saccharide zu eluieren (Campos et al. 2017; Hidaka et al. 1988; Kuhn und Filho 2010; Nobre et al. 2012).

#### **4.2.5.2 Anwendung von Aktivkohle zur Aufreinigung der in dieser Arbeit produzierten I-FOS**

In dieser Studie wurden die ausgezeichneten Adsorptionskapazitäten von Aktivkohle genutzt, um die Reinheit von I-FOS in dem durch InuGB-V3-Rohenzym hergestellten Sirup durch ein Batch-

Aufreinigungsverfahren zu erhöhen (Kapitel 3.6.2). Fast alle Monosaccharide (> 96 %) und der größte Teil der Saccharose (60 %) konnten mit Aktivkohle entfernt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. Hidaka et al. (1988) und Nobre et al. (2012) konnten ebenfalls zeigen, dass der Großteil der Monosaccharide, die in einer scFOS-reichen Reaktionslösung oder in Fermentationsbrühe enthalten waren, mit Wasser von der Aktivkohle eluiert wurden. Wie in der Literatur beschrieben wurde, wurde auch in dieser Arbeit der Großteil der verbleibenden hochkalorischen Zucker wurden mit niedrigen Ethanol-Konzentrationen entfernt, obwohl einige I-FOS während dieser Schritte verloren gingen (Kapitel 3.6.1, (Campos et al. 2017; Kuhn und Filho 2010; Nobre et al. 2012; Romano et al. 2016). Einige Autoren berichteten ebenfalls über die gemeinsame Elution von Saccharose und kurzkettigen I-FOS, was die Auftrennung dieser Verbindungen erschwerte (Kapitel 3.6.1, Kuhn und Filho 2010; Campos et al. 2017).

Die vollständige Elution von an Aktivkohle gebundenen I-FOS erfordert hohe Ethanol-Konzentrationen. In einigen Fällen wurde berichtet, dass Ethanol-Konzentrationen von 15 – 30 % [v/v] für die Elution von FOS, insbesondere von scFOS, ausreichend sind (Campos et al. 2017; Hidaka et al. 1986; Kuhn et al. 2014; Kuhn und Filho 2010; Nobre et al. 2012; Romano et al. 2016). In anderen Veröffentlichungen wurden Ethanol-Konzentrationen von bis zu 50 % [v/v] für die vollständige Elution von gebundenen I-FOS verwendet (Morales et al. 2006; Sanz et al. 2005). In dieser Arbeit wurde der Großteil ( $70,3 \pm 3,9$  %) der gebundenen I-FOS mit 30 % Ethanol [v/v] eluiert. Für die Elution der restlichen I-FOS wurden 50 und 80 % Ethanol [v/v] verwendet. Schließlich konnte eine I-FOS-Reinheit von mehr als 89 % [w/w] und eine I-FOS-Rückgewinnung von mehr als 80 % erzielt werden. Diese Ergebnisse stimmen gut mit anderen erfolgreichen Anwendungen von Aktivkohle für die Aufreinigung von I-FOS oder scFOS überein, bei denen eine Reinheit von 80-94 % erzielt wurde (Campos et al. 2017; Kuhn et al. 2014; Kuhn und Filho 2010; Nobre et al. 2012; Romano et al. 2016).

Aus den erzielten Ergebnissen und anderen Studien ist erkennbar, dass der Reinheitsgrad der I-FOS negativ mit der I-FOS-Rückgewinnung korreliert. Falls gewünscht, könnte eine höhere Reinheit erzielt werden, indem mehr Elutionsschritte oder Elutionsschritte mit höheren Ethanol-Konzentrationen zur Entfernung von Saccharose eingeführt würden. Dies würde jedoch zu einer geringeren Rückgewinnung der I-FOS führen. Campos et al. (2017) beobachteten beispielsweise eine höhere Reinheit (92,4 statt 90 %), aber eine geringere Rückgewinnung (72,0 statt 86,7 %), wenn drei (5, 10 und 30 % Ethanol [v/v]) statt zwei Elutionsschritte (7,5 und 30 % Ethanol [v/v]) bei der I-FOS-Aufreinigung angewendet wurden. Ähnliches wurde in zwei Studien von Kuhn et al. bei der Aufreinigung eines identischen scFOS-reichen Sirups beobachtet (Kuhn und Filho 2010; Kuhn et al. 2014). Bei der kontinuierlichen Durchspülung der Aktivkohle mit 15 %igem Ethanol,

wurde eine scFOS-Reinheit von 80 % und eine scFOS-Rückgewinnung von 97,8 % erreicht (Kuhn und Filho 2010). Bei der Anwendung von 3,5 % Ethanol zur Entfernung der Mono- und Disaccharide und 15 % Ethanol zur Elution der scFOS, erzielten die Autoren dahingegen eine scFOS-Reinheit von 94 % und eine scFOS-Rückgewinnung von 57 % (Kuhn et al. 2014).

Kontinuierliche Aufreinigungs-Verfahren, bei denen Festbettsäulen mit Aktivkohle als Packmaterial verwendet werden, können gute Ergebnisse bei der Aufreinigung von FOS liefern (Kuhn et al. 2014; Kuhn und Filho 2010). Allerdings erfordern kontinuierliche Ansätze spezialisiertes Equipment und sind in der Handhabung komplex. Das in dieser Arbeit angewendete Aufreinigungs-Verfahren zeichnet sich durch das unkomplizierte Batch-Setup und seine einfache Durchführung aus, welches keine aufwendige Instrumentation erfordert. Aus diesen Gründen eignet sich das Verfahren besonders gut für den Einsatz im Labormaßstab. Darüber hinaus ließe sich diese Methode aufgrund der kostengünstigen Aktivkohle und der Möglichkeit zur Regeneration von Aktivkohle und Elutionsmittel ebenfalls hochskalieren (Kruschitz und Nidetzky 2020).

Die Verwendung von Aktivkohle zur Entfernung der hochkalorischen Zucker bietet den Vorteil, dass sowohl der Biokatalysator als auch andere Substanzen, die die Lebensmittel-Reinheit beeinträchtigen würden, ebenfalls durch die Aktivkohle entfernt werden, sodass keine zusätzlichen Aufreinigungsschritte erforderlich sind (Kruschitz und Nidetzky 2020). Durch die Steigerung der I-FOS-Reinheit von 53 auf 89 % wurde der präbiotische Wert des in dieser Arbeit hergestellten Produktes erheblich erhöht, was die Möglichkeit eröffnet, die I-FOS in gesunden Diät-Lebensmitteln einzusetzen. Darüber hinaus konnten die in dieser Arbeit produzierten I-FOS nach der Aufreinigung als Wachstumssubstrat für kommensale Bakterien der menschlichen Darmmikrobiota eingesetzt werden.

### **4.3 Untersuchungen zum Wachstum kommensaler Darmbakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs**

In der neueren Forschung wurden zahlreiche kommensale Darmbakterien identifiziert, die potenziell förderlich für die Gesundheit sind (O'Toole et al. 2017). In den 1990er Jahren lag der Schwerpunkt bei der Entwicklung der ersten Präbiotika noch auf der Förderung des Wachstums von Bifidobakterien, Milchsäurebakterien der Gattung *Lactobacillus* und anderen probiotischen

Bakterien (Gibson et al. 2017; Gibson et al. 1995; Gibson und Shepherd 2010). Demzufolge wurden Kohlenhydrat-basierten Präbiotika eine Stimulation von Bifidobakterien und *Lactobacillus*-Bakterien nachgewiesen (Gibson et al. 2017; Gibson et al. 1995; Moro et al. 2002), ebenso wie verschiedene gesundheitliche Wirkungen (Krumbeck et al. 2016).

So zeigten Interventionsstudien, dass der Verzehr von Inulin zu einer Zunahme der relativen Abundanz von Bakterien der Gattung *Bifidobacterium* von 7 % auf 15 % führte (Healey et al. 2018), bzw. zu einer Vermehrung der Spezies *B. longum* (Hiel et al. 2019), *B. angulatum*, *B. ruminantium* und *B. adolescentis* (Kiewiet et al. 2021) führte. Auch die Supplementation der Ernährung mit 5 – 20 g scFOS pro Tag führte zu einer erhöhten Abundanz der fäkalen Bifidobakterien (Bouhnik et al. 1999). Healey et al. (2018) beobachteten in ihrer Studie neben der Zunahme von Mitgliedern der Gattung *Bifidobacterium* auch eine Steigerung der Abundanz von *Lactobacillus*-Bakterien von 0,3 % auf 1,3 % nach dem Verzehr von Inulin. In einer anderen Studie wurde eine 2,4-fache Zunahme der *Lactobacillus*-Bakterien nach dem Einsatz von sehr langkettigem Inulin beschrieben (Costabile et al. 2010).

Neben Bakterien der Gattung *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* können jedoch auch zahlreiche andere kommensale Darmbakterien Fructane als Wachstums-Substrat nutzen, wie beispielsweise *Bacteroides*, *Roseburia*- und *Clostridium*-Spezies (Adamberg et al. 2015; Mao et al. 2015; Scott et al. 2014). Darunter sind kommensale Bakterien die als gesundheitsförderlich gelten (Adamberg et al. 2015; Scott et al. 2014). Beispielsweise sind *F. duncaniae* und *Clostridium butyricum* potenzielle Probiotika der nächsten Generation (Grenda et al. 2022; Verstraeten et al. 2023) die auf einigen verschiedenen Fructanen wachsen können (Hidaka et al. 1986; Sakamoto et al. 2022; Tanno et al. 2021). Aber auch einige Darmbakterien, die mit Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, nutzen Fructane zum Wachstum. Zum Beispiel wird das Darmbakterium *Dorea longicatena* mit Reizdarmsyndrom assoziiert (Rajilić–Stojanović et al. 2011; Saulnier et al. 2011) und kann Inulin und I-FOS als Wachstumssubstrat nutzen (Taras et al. 2002). Sogar viele Stämme des bedeutenden humanen Krankheitserregers *Pneumococcus pneumoniae*, der u. a. Pneumonie und Meningitis verursachen kann, können FOS und Inulin als Substrat nutzen (Linke et al. 2013), ebenso wie das Vogelpathogen *E. coli* BEN2908 (Schouler et al. 2009).

Zudem wurde festgestellt, dass die Reaktion von Studienteilnehmern auf die Administration von Präbiotika sehr unterschiedlich sein kann. Innerhalb von Interventionsstudien treten regelmäßig sogenannte Non-Responder auf, bei denen keine signifikanten Veränderungen durch die Einnahme von Präbiotika festgestellt werden (Swanson et al. 2020b). Und wenn durch die Präbiotika-Einnahme Veränderungen hervorgerufen werden, sind diese oft spezifisch für die

Individuen (Swanson et al. 2020a). Selbst ähnlich aufgebaute Studien liefern oft widersprüchliche Ergebnisse, was die Wirkungen der Präbiotika sowie die Beziehung zwischen der Art und Dosierung der Präbiotika betrifft (Krumbeck et al. 2016; Swanson et al. 2020a; Valcheva et al. 2019; Wilson und Whelan 2017).

Neben einer fehlenden Wirkung kann der Verzehr von Kohlenhydrat-basierten Präbiotika in manchen Personen mit funktionellen Darmerkrankungen unangenehme und schmerzhaft Nebenwirkungen verursachen, wie einem übermäßigen Blähbauch, Flatulenzen, Bauchkrämpfe, Appetitlosigkeit, Schwitzen, Durst und Durchfall (Di Bartolomeo et al. 2013; Stribling und Ibrahim 2023). Aus diesem Grund wird bei Patienten mit gastrointestinalen Störungen wie Reizdarmsyndrom und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (IBD) seit einigen Jahren eine Ernährungs-Intervention angewendet, bei der Lebensmitteln mit einem hohen Gehalt an Fructanen und einigen anderen schlecht absorbierbaren und schnell fermentierbaren Kohlenhydraten (sogenannte FODMAPs = *fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, and polyols*), reduziert werden (Ispiryan et al. 2022). FODMAPs sind in der Ernährung weit verbreitet und umfassen das Monosaccharid Fructose, das Disaccharid Lactose, Oligosaccharide (Fructane und Galactane) sowie Polyole (z. B. Sorbitol, Mannitol) (Gibson und Shepherd 2010). Die Reduzierung des Verzehrs von FODMAP-reichen Lebensmitteln konnte zu einer Besserung der Symptome bei Patienten mit Reizdarmsyndrom führen (Harvie et al. 2017). Auch bei gesunden Menschen können bei übermäßigem Verzehr der Präbiotika unter Umständen Nebenwirkungen wie erhöhte Flatulenz (> 30 g FOS pro Tag), Blähungen (> 40 g FOS pro Tag) oder sogar Bauchkrämpfe und Diarrhö (> 50 g pro Tag) auftreten (Briet et al. 1995).

Die funktionellen Darmsymptome werden vermutlich durch die übermäßige Fermentation und osmotische Wirkung von FODMAPs im distalen Dünndarm und proximalen Dickdarm verursacht. Die durch die Fermentation gebildeten Gase und die durch die osmotische Wirkung erhöhte Wassermenge im intestinalen Lumen führt zu einer Dehnung des Darms (Gibson und Shepherd 2010). Außerdem wird in Patienten mit Reizdarmsyndrom, Zöliakie und Morbus Crohn häufig eine bakterielle Überwucherung/Fehlbesiedlung des distalen Dünndarms sowie eine erhöhte Permeabilität der Darmbarriere beobachtet (Gibson und Shepherd 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass die erhöhte Darmpermeabilität möglicherweise auf die Zufuhr von FODMAPs und dadurch hervorgerufene hohe Konzentrationen von SCFAs und Lactat zurückzuführen ist (Gibson und Shepherd 2005).

Bedeutende Einschränkungen der FODMAP-reduzierten Ernährung liegen in der signifikanten Reduktion der Abundanz und Diversität der Darmmikroorganismen sowie potenziellen Nährstoffmängeln (Molina-Infante et al. 2016). Die Restriktion von (u. a. präbiotischen)



Ballaststoffen könnte außerdem negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Dickdarms haben (Gibson und Shepherd 2010). Deshalb ist diese Diät nur für Menschen mit funktionellen Darmbeschwerden und nicht allgemein zu empfehlen (Gibson und Shepherd 2010). Die langfristigen Folgen einer FODMAP-reduzierten Ernährung sind zurzeit noch unklar, weshalb alternative Strategien, die sowohl die Symptome lindern als auch vorteilhafte Darmbakterien fördern, von Interesse (Stribling und Ibrahim 2023).

Zusammenfassend haben Fructane das Potential unterschiedliche Effekte hervorzurufen (Scott et al. 2014). Mikrobiom-basierte Therapien führen oft zu uneinheitlichen interindividuellen Ergebnissen (Fan et al. 2023; Gibbons et al. 2022) und die Reaktion von Menschen auf diätetische und präbiotische Interventionen ist kaum vorhersagbar (Sonnenburg et al. 2010). Die mangelnde Vorhersagbarkeit, wie die Mikrobiota auf solche Ernährungseingriffe reagiert, spiegelt unser begrenztes Verständnis der Nährstofferkennung und -verwertung durch Mitglieder der Darmmikrobiota wider. (Sonnenburg et al. 2010). Deshalb ist ein tiefergehendes Verständnis zur Wirkungsweise von Fructanen nötig, um sie gezielt und mit dem gewünschten Ergebnis als Präbiotikum einsetzen zu können. (Mao et al. 2015).

Zur weiteren Aufklärung der Fructan-Metabolisierung durch Darmbakterien wurden in dieser Arbeit Wachstumsversuche mit kommensalen Darmbakterien durchgeführt, bei denen die zuvor synthetisierten bakteriellen I-FOS und weitere Inulin- und Levan-basierten Fructane verwendet wurden.

#### **4.3.1 Substrat-Spezifität und Fructan-Abbau-Mechanismen der Darmbakterien**

Der molekulare Mechanismus der Fructan-Metabolisierung ist noch nicht vollständig entschlüsselt, erfordert jedoch das Zusammenspiel verschiedener Fructan-degradierender Enzyme und Transporter (Chen et al. 2015; Mao et al. 2015). Die Fähigkeit eines Bakteriums, bestimmte Fructane für das Wachstum zu nutzen, hängt von den vorhandenen Enzymen und Transportern ab und ist daher Stamm-spezifisch (Joglekar et al. 2018). Grundsätzlich lässt sich die Fructan-Metabolisierung in bis zu vier Schritte aufteilen: 1) extrazelluläre Hydrolyse von Fructanen durch Zelloberflächen-assoziierte Enzymen zu Monosacchariden oder FOS, 2) Import der Hydrolyse-Produkte oder Fructane über Transporter, 3) Hydrolyse der Fructane/FOS durch intrazelluläre oder periplasmatische Enzyme und 4) Einspeisung der Monosaccharide in den Zentralstoffwechsel (Wang et al. 2020). Die Spezifität der Enzyme und Transporter sowie die Lokalisierung der Enzyme (intra-, extrazellulär, periplasmatisch) bewirken die variierenden Fähigkeiten der Mikroorganismen zur Fructan-Metabolisierung und zeigen, dass

Mikroorganismen unterschiedliche Strategien verfolgen, um Fructane als Substrat zu nutzen (Boger et al. 2018; Goh und Klaenhammer 2015; Joglekar et al. 2018).

Es gibt eine Reihe an Fructan-degradierenden Glycosidasen, die den Glycosid-Hydrolyse-Familien (GH) 32 und GH91 zugeordnet werden (Drula et al. 2022; Singh et al. 2017, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Einige dieser Glycosidasen sind äußerst spezifisch und katalysieren fast ausschließlich die Hydrolyse von (2→1)-verknüpften β-D-Fructofuranose-Resten durch einige Inulinasen (EC 3.2.1.7, Singh et al. 2017) oder (2→6)-verknüpften β-D-Fructofuranose-Resten durch Levanasen (EC 3.2.1.65, Zhang et al. 2019). Abhängig von ihrem Hydrolysierungs-Mechanismus wird zwischen *exo*- und *endo*-agierenden Inulinasen bzw. Levanasen unterschieden. *Endo*-Inulinasen (EC 3.2.1.7) und *endo*-Levanasen (EC 3.2.1.65) spalten glycosidische Bindungen innerhalb eines Fructan-Moleküls des Inulin- bzw. Levan-Typs, wodurch Fn-Typ FOS generiert werden (Singh et al. 2017; Zhang et al. 2019). Im Gegensatz dazu spalten *exo*-Inulinasen (E.C.3.8.1.80) und *exo*-Levanasen (EC 3.2.1.65) schrittweise die terminalen Fructose-Einheiten vom nicht-reduzierenden Ende der Fructane (Inulin- bzw. Levan-Typ) ab, wodurch Fructose freigesetzt wird (Singh et al. 2017; Zhang et al. 2019). *Exo*-agierende Inulinasen und Levanasen weisen zusätzlich eine Invertase-Aktivität auf (β-Fructofuranosidase EC 3.2.1.26), die Saccharose zu Glucose und Fructose hydrolysiert (Singh et al. 2017). Weitere Fructan-degradierende Enzyme sind Exohydrolasen (1-Exohydrolase EC3.2.1.153 bzw. 6-Exohydrolase EC 3.2.1.154), die bevorzugt I- bzw. L-FOS mit der Struktur von GF2-3 abbauen, sowie Levanbiose-synthetisierende β-(2,6)-Fructan-6-Levanbiohydrolasen (EC3.2.1.64) und verschiedene Fructotransferasen (EC 4.2.2.16, EC 4.2.2.17, EC 4.2.2.18), die Difructose-Dianhydride aus Inulin bzw. Levan freisetzen (Singh et al. 2017, Zhang et al. 2019).

Bisher wurden ATP-Transporter (Barrangou et al. 2003; Linke et al. 2013), Permeasen des *major facilitator superfamily*-Typs (MFS) (O'Donnell et al. 2011; Schouler et al. 2009), Phosphotransferase-Systeme (PTS) (Barrangou et al. 2006; Chen et al. 2015; Wang et al. 2020) sowie SusCD-Komplexe (Joglekar et al. 2018; Sonnenburg et al. 2010) identifiziert, die an dem Transport von Fructanen beteiligt sind.

Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die Struktur der Fructane eine große Rolle bei der Metabolisierung spielt (Falony et al. 2009; Pohlentz et al. 2022; Rossi et al. 2005; Scott et al. 2014). Auch in dieser Arbeit wurden Unterschiede in den Fähigkeiten der untersuchten Darmbakterien zur Fructan-Metabolisierung festgestellt.

Neun der elf untersuchten Bakterienstämme waren in der Lage, mindestens eines der Fructane zum Wachstum zu nutzen. *P. johnsonii*, *D. formicigenerans* und *A. rectalis* zeigten dabei eine hohe Spezifität für I-FOS. Die Mehrheit der Bakterien konnte jedoch sowohl Inulin-artige als auch Levan-artige Fructane hydrolysieren, wobei häufig unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten und Biomasse-Ausbeuten auf den verschiedenen Substraten zu beobachten waren.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen an Fructan-degradierenden Enzymen, die eine variable Substrat-Spezifität aufzeigten. Einige Enzyme sind höchst spezifisch und hydrolysieren nur  $\beta$ -(2,1)- bzw.  $\beta$ -(2,6)-Verknüpfungen (Zhang et al. 2019). Zum Beispiel zeigen die Levanasen aus *Pseudomonas* K-52 (Kang et al. 1998), *Bacillus subtilis* (Jensen et al. 2016) und *Actinomyces viscosus* (Igarashi et al. 1987) nur mit Levan als Substrat hydrolytische Aktivität. Die Mehrheit der Glycosidasen weist jedoch eine breit gefächerte Substrat-Spezifität auf, sodass die Enzyme in der Lage sind sowohl Inulin als auch Levan und Saccharose (u. A.) zu hydrolysieren (Muñoz-Gutiérrez et al. 2009; Wanker et al. 1995). Oft zeigen diese Enzyme eine Präferenz für ausgewählte Fructane, können jedoch auch andere Substrate langsam degradieren (Muñoz-Gutiérrez et al. 2009). So zeigen die Levanasen aus *Rhodotorula* sp. (Chaudhary et al. 1996), *Treponema zioleckii* (Kasperowicz et al. 2010) und *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Menéndez et al. 2002) Aktivität gegenüber Levan, Inulin und scFOS. Ebenso reagiert die *exo*-Inulinase aus *Pseudomonas mucidolens* mit Levan, Inulin, Saccharose und Raffinose (Kwon et al. 2000). Die  $\beta$ -Fructofuranosidase aus *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* erreichte ihre höchste Aktivität mit L-FOS, konnte jedoch auch I-FOS, Inulin, Agavin und Levan hydrolysieren (Ávila-Fernández et al. 2016).

Neben dem Verknüpfungstyp des Fructans hat insbesondere die Kettenlänge einen signifikanten Einfluss auf die Fermentierbarkeit. In Wachstumsexperimenten, in denen sowohl I-FOS mit steigendem DP als auch Inulin an verschiedene Bifidobakterien-Stämme und repräsentative, Butyrat-produzierende Bacillota-Bakterien verfüttert wurden, ließen sich zwei Hauptmerkmale der Metabolisierung klar erkennen (Falony et al. 2009; Roberfroid et al. 1998; Rossi et al. 2005; Scott et al. 2014; Wang et al. 2020). Zum einen sank die Anzahl der zum Fructan-Abbau fähigen Bakterien mit steigendem Polymerisierungsgrad. Kurzkettige I-FOS erwiesen sich als unspezifisches Wachstumssubstrat, das von fast allen untersuchten Bakterien genutzt werden konnte. Dahingegen zeigten nur wenige der Bifidobakterien und Bacillota-Bakterien Wachstum auf Inulin bzw. I-FOS mit höherem DP (Falony et al. 2009; Rossi et al. 2005, Scott et al. 2014). Zum anderen stimulierten kurzkettige I-FOS das Wachstum von Bifidobakterien in vielen Fällen stärker

als mittel- oder langkettige I-FOS bzw. Inulin (Roberfroid et al. 1998; Wang et al. 2020). Entsprechend diesen Ergebnissen konnten Pohlentz et al. (2022) nachweisen, dass die Verfütterung von L-FOS mit Kettenlängen von DP2 und DP3 an drei *Bifidobacterium*-Stämme sowie *Lactobacillus paracasei* zu einer höheren Biomasse-Ausbeute führte als bei der Supplementation mit L-FOS höheren Polymerisierungsgrads.

Auch in dieser Arbeit war auffallend, dass eine deutlich größere Anzahl der untersuchten Bakterienstämme in der Lage war, FOS zu metabolisieren, im Vergleich zu den polymeren Fructanen. Nur vier der elf untersuchten Bakterien (*F. duncaniae*, *S. copri*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens*) zeigten Wachstum auf Inulin bzw. Levan. Zudem ermöglichten die FOS-Substrate in den meisten Fällen eine höhere Biomasse-Produktion als die polymeren Fructane, die zumeist nur unvollständig verstoffwechselt wurden. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass sowohl I-FOS als auch L-FOS Substrate sind, die von vielen Darmbakterien genutzt werden können. Es scheint, dass die geringe Kettenlänge größere Relevanz hat als der Verknüpfungstyp. Weiterhin konnten nur *F. duncaniae* und *S. copri* sowohl Inulin als auch Levan als Substrat nutzen. Bei polymeren Fructanen scheint demnach wiederum eine höhere Spezifität für den Verknüpfungstyp gegeben zu sein.

Auch bezüglich des DP's entscheiden die von den Bakterien gebildeten Enzyme und Transporter darüber, welche Fructane abgebaut werden können. Bakterien, die extrazelluläre *exo*-agierende  $\beta$ -Fructofuranosidasen besitzen, können die durch die Hydrolyse freigesetzte Fructose und ggf. auch Saccharose und Glucose über spezialisierte PTSs aufnehmen. Dieser Mechanismus wird basierend auf Wachstumsversuchen und Genom-Analysen für *Lactobacillus salivarius* und *Lactobacillus paracasei* vermutet (Boger et al. 2018). Aber auch *exo*-agierende  $\beta$ -Fructofuranosidasen können je nach DP unterschiedliche Substrate präferieren. Beispielsweise zeigte eine Untersuchung, dass die *exo*- $\beta$ -Fructofuranosidase aus *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Agavin und Inulin mit geringem Molekulargewicht schneller hydrolysierte als Fructane mit hohem Molekulargewicht (Cuevas-Juárez et al. 2017). Von zwei kürzlich aus *Glutamibacter mishrai* isolierten *exo*-Inulinasen (INU1 und INU2), wies INU1 mit 1-Kestotriose und Saccharose deutlich höhere Aktivitäten auf als mit längerkettigen Fructanen. Dahingegen präferierte INU2 die längerkettigen Fructane im Vergleich zu 1-Kestotriose (Lian et al. 2022).

In Bakterien mit intrazellulären  $\beta$ -Fructofuranosidasen müssen FOS/Polymere über Transport-Proteine aufgenommen werden. Bisher wurde nur wenige Transport-Systeme identifiziert, über

die langkettige Fructane in die Zelle aufgenommen werden (Joglekar et al. 2018; Linke et al. 2013). Es wurden jedoch mehrere Transporter beschrieben, die die Aufnahme von FOS vermitteln (Barrangou et al. 2003; Linke et al. 2013; Saulnier et al. 2007; Sonnenburg et al. 2010; Wang et al. 2020).

In *Lactobacillus plantarum* wurde ein Saccharose-PTS nachgewiesen, über welches neben Saccharose auch scFOS des GFn-Typs aufgenommen werden konnten (Saulnier et al. 2007). Die Autoren Wang et al. (2020) beschrieben ein PTS das in zahlreichen Bacillota-Bakterien der Darmmikrobiota, insbesondere *Dorea*-Spezies, hochkonserviert ist. Dieser PTS-Transporter konnte 1-Kestotriose binden, transportieren und phosphorylieren (Wang et al. 2020).

Am Fructan-Abbau beteiligte ABC-Transporter wurden in *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Pneumococcus*-Stämmen nachgewiesen (Barrangou et al. 2003; Boger et al. 2018; Linke et al. 2013). *Lactobacillus acidophilus* verfügt über einen ABC-Transporter, der den Import von scFOS und I-FOS ermöglicht (Barrangou et al. 2003). Die meisten der von Linke et al. (2013) untersuchten Pneumococccen-Stämme konnten neben scFOS auch langkettige FOS und Inulin nutzen. Diese Fähigkeit war auf einen ABC-Transporter zurückzuführen, der von diesen Pneumococccen-Stämmen kodiert wird. Pneumococccen-Spezies, die einen alternativen Transporter besaßen, konnten lediglich scFOS metabolisieren (Linke et al. 2013).

SusCD-Transporter-Komplexe sind typisch für *Bacteroides*-Spezies. Der genetische und molekulare Mechanismus der Fructan-Metabolisierung in *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. thetaiotaomicron*) wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht (Glenwright et al. 2017; Joglekar et al. 2018, Sonnenburg et al. 2010). Ähnlich wie beim Abbau anderer Polysaccharide sind die Gene für die Fructan-degradierenden und importierenden Proteine in einem co-regulierten Cluster, einem *polysaccharide utilization loci* (PUL), organisiert (Glenwright et al. 2017). Das archetypische PUL in *Bacteroides* ist das *starch utilization system* (*sus*), in welchem sieben Proteine (SusA – SusG) für den Stärke-Abbau kodiert sind (Glenwright et al. 2017). Ein charakteristisches Merkmal der PULs ist die Präsenz von *susD*- und *susC*-homologen Genen (Sonnenburg et al. 2010). Die Proteine SusC und SusD bilden einen Komplex, der als Transporter in der äußeren Membran integriert ist. Der Stamm *B. thetaiotaomicron* VPI-5482, der Levan abbauen kann, besitzt einen SusCD-Komplex der spezifisch für  $\beta$ -2,6-Fructosyl-Fructose ist (Sonnenburg et al. 2010). Kristallstruktur-Analysen dieses SusCD-Komplexes haben offenbart, dass der Transporter mittels eines „Treteimer-Mechanismus“ das Substrat bindet und ins Periplasma transportiert (Glenwright et al. 2017). SusC dient dabei als „Deckel“, der durch scharnierartige Konformationsänderungen eine Substrat-Bindestelle freilegt oder den aus einem SusC-Dimer gebildeten „Eimer“ verdeckt, um das Substrat einzuschließen (Glenwright et al. 2017). Das nicht-katalytische, Zelloberflächen-assoziierte Protein SusE ist ebenfalls für Levan spezifisch (Sonnenburg et al. 2010). Aktuell wird vermutet, dass SusE

notwendig ist, um Levan-Moleküle zu binden und zu der in der äußeren Zellmembran verankerten *endo*-Levanase zu führen (Ernits et al. 2019). Die *endo*-Levanase hydrolysiert Levan zu L-FOS, die von dem SusCD-Transporter gebunden und ins Periplasma transportiert werden (Sonnenburg et al. 2010). Dort erfolgt die weitere Degradation durch *exo*-agierende  $\beta$ -Fructosidasen (Sonnenburg et al. 2010).

Die extrazelluläre *endo*-Levanase in *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 ist essenziell für das Wachstum mit hochmolekularen Levan. Fehlt dieses Enzym, kann der Stamm lediglich L-FOS nutzen (Sonnenburg et al. 2010). Im Gegensatz dazu verwertet *B. thetaiotaomicron* 8736 Inulin, ohne eine Zelloberflächen-assoziierte *endo*-Inulinase zu besitzen. In diesem Bakterien-Stamm wird Inulin direkt über einen SusCD-Komplex ins Periplasma aufgenommen, welcher homolog zu dem in *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 vorhandenen SusCD-Komplex ist. Möglicherweise erklärt sich diese Tatsache durch den geringeren durchschnittlichen DP von Inulin (~25). Levan kann *B. thetaiotaomicron* 8736 nicht nutzen (Joglekar et al. 2018).

Zusammenfassend lässt sich anhand der beschriebenen Literatur feststellen, dass zur Metabolisierung von polymeren Fructanen hoch-spezialisierte Transporter oder extrazelluläre Enzyme notwendig sind. In den meisten Fällen werden Fructane mit geringem DP Fructanen mit höherem DP vorgezogen und zur Metabolisierung von kurzkettigen FOS sind mehr Bakterien in der Lage. Diese Tatsachen erklären auch die bei einigen Bakterien beobachtete unvollständige Metabolisierung sowie das biphasische Wachstum auf einigen Substraten (Kapitel 3.7.2.3 und 3.7.2.4). Die in dieser Arbeit verwendeten Fructane lagen alle als polydisperse Mischung aus Molekülen mit verschiedener Kettenlänge vor. Bei unvollständiger Verwertung der Substrate (*S. copri*, *F. duncaniae*, *P. johnsonii*) kann angenommen werden, dass die notwendige Maschinerie zur Degradation von Fructanen mit hohem DP nicht vorhanden ist, sodass die im Substrat enthaltene Fructane mit hohem DP nicht genutzt werden konnten (Scott et al. 2014). Das beobachtete biphasische Wachstum einiger Bakterien auf bestimmten Substraten (*P. johnsonii*, *B. intestinalis*, *A. rectalis* und *D. formicigenerans* auf den I-FOS, *F. duncaniae* auf den polymeren Fructanen und *R. gnavus* auf den L-FOS) deutet auf die präferierte Aufnahme von sehr kurzkettigen Komponenten des Substrates hin. In der zweiten lag-Phase erfolgt die Expression der zur Verstoffwechslung der längeren Fructane notwendigen Transporter oder Enzyme (Scott et al. 2014).

### 4.3.2 Wachstum von Bacteroidota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

Die Kultivierungsversuche in dieser Arbeit zeigten, dass die untersuchten Bakterien des Phylums Bacteroidota eine höhere Anzahl der angebotenen Fructane metabolisieren konnten als die Bakterien des Phylums Bacillota. So nutzten drei der untersuchten Bacteroidota-Bakterien alle FOS und mind. ein polymeres Fructan zum Wachstum, während *F. duncaniae* das einzige untersuchte Bacillota-Bakterium war, welches dazu ebenfalls in der Lage war. Tatsächlich zeichnen sich viele Spezies des Phylums Bacteroidota durch die Fähigkeit aus, eine große Bandbreite an Polysacchariden abzubauen zu können (Ernits et al. 2019; Grondin et al. 2017). In der Literatur wurden 15 *Bacteroides*-Spezies beschrieben, die auf I-FOS bzw. Inulin wachsen können (Colnet et al. 2021; Desai et al. 2016; Mao et al. 2015). Die Metabolisierung von Levan wurde dahingegen bisher nur bei wenigen *Bacteroides*-Spezies beobachtet (Colnet et al. 2021; Desai et al. 2016).

Unter den untersuchten Bacteroidota-Bakterien konnten nur *B. intestinalis* und *S. copri* durch Levan in ihrem Wachstum gefördert werden. Tatsächlich wurde Levan fast vollständig von *B. intestinalis* verstoffwechselt. Auch die L-FOS wurden effizient von *B. intestinalis* genutzt (Kapitel 3.7.2.3). In der Arbeit von Colnet et al. (2021) wurde mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Stamm (*B. intestinalis* DSM 17393) Wachstum sowohl mit Levan als auch mit kurzkettigem Inulin beobachtet. Damit einhergehend konnte *B. intestinalis* in dieser Arbeit I-FOS ausgezeichnet verwerten. Auf dem langkettigen Inulin war dahingegen kein Wachstum zu beobachten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer dreimonatigen Ernährungs-Intervention mit Inulin bei adipösen Frauen, bei der die relative Häufigkeit von *B. intestinalis* reduziert wurde (Dewulf et al. 2013).

Insbesondere *S. copri* (DSM 18205) wies eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Verstoffwechslung der eingesetzten Fructane auf und zeigte intensives Wachstum auf allen FOS und Inulin sowie eine teilweise Metabolisierung von Levan (Kapitel 3.7.2.3). Tatsächlich wurde in *S. copri* ein distinkter PUL für die Degradation von Inulin identifiziert (Li et al. 2021a) und die Metabolisierung von Nystose (Dridi et al. 2023) sowie Inulin (Fehlner-Peach et al. 2019; Li et al. 2021a) wurde bestätigt. Das hervorragende Wachstum von *S. copri* auf L-FOS wurde erstmals in dieser Arbeit gezeigt. Der Stamm *S. copri* HDD04 konnte Levan ebenfalls in geringem Maße metabolisieren (Li et al. 2021). Im Gegensatz dazu konnten die Autoren Fehlner-Peach et al. (2019) keine Zunahme der Zelldichte in Kulturen des in dieser Arbeit verwendeten Stammes (DSM 18205) bei Supplementation mit Levan nachweisen, möglicherweise aufgrund von Unterschieden in den Molekulargewichten der verwendeten Levane. Die unvollständige Verwertung von Levan und das ausgezeichnete

Wachstum von *S. copri* auf L-FOS legen nahe, dass nur die im Levan enthaltenen Moleküle mit eher geringem Molekulargewicht durch das Bakterium verstoffwechselt werden können.

*B. xylanisolvens* (DSM 18836) konnte alle FOS zum Wachstum nutzen und Inulin fast vollständig verwerten (Kapitel 3.7.2.3). Damit wurde die Beobachtung von Colnet et al. (2021) bestätigt, dass *B. xylanisolvens* Levan nicht nutzen kann, kurzkettiges Inulin dahingegen schon. Die Wachstumsförderung von *B. xylanisolvens* mit L-FOS wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Von *P. vulgatus* und *P. johnsonii* wurde nur eine begrenzte Anzahl an Fructanen verwertet. Keines der beiden Bakterien konnte die Polymere abbauen. *P. vulgatus* (DSM 1447) war jedoch in der Lage, sowohl I-FOS als auch L-FOS für das Wachstum zu nutzen (Kapitel 3.7.2.3). Die Kultivierung von *P. vulgatus* B1447 auf I-FOS (Hidaka et al. 1986; Scott et al. 2014; Van Laere et al. 2000) scFOS (Bolam und Sonnenburg 2011) und L-FOS (Rakoff-Nahoum et al. 2014) ist dokumentiert. Die Untersuchungen von Bolam und Sonnenburg (2011) sowie Rakoff-Nahoum et al. (2014) kamen wie diese Studie zu dem Schluss, dass *P. vulgatus* Inulin nicht nutzen kann. Im Gegensatz dazu wuchs *P. vulgatus* B1447 in der Arbeit von Scott et al. (2014) auf Inulin.

In dieser Arbeit wurde herausgearbeitet, dass *P. johnsonii* ausschließlich kurzkettige Fructane des Inulin-Typs metabolisiert (Kapitel 3.7.2.3). Colnet et al. (2021) berichteten, dass *P. johnsonii* Inulin verwertet, was jedoch vermutlich auf die im Substrat enthaltenen I-FOS zurückzuführen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind der erste Nachweis, dass *P. johnsonii* L-FOS nicht nutzen kann. Die Tatsache, dass *P. johnsonii* auch Levan nicht nutzte (Kapitel 3.7.2.3, Colnet et al. 2021), zeigt, dass das Bakterium eine hohe Spezifität für I-FOS aufweist und nicht in der Lage ist, Levan-artige Fructane zu verwerten.

### 4.3.3 Wachstum von Bacillota-Bakterien auf Fructanen des Inulin- und Levan-Typs

*F. duncaniae* zeigte eine herausragende Fähigkeit zur Nutzung verschiedener Fructane (Kapitel 3.7.2.4). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass *F. duncaniae* auf scFOS (Tanno et al. 2021) und Inulin (Sakamoto et al. 2022) als Substrat wachsen kann. Damit einhergehend führte eine diätische Interventions-Studie mit Inulin (angereichert mit I-FOS) zu einer höheren relativen Häufigkeit von *Faecalibacterium*-Bakterien im Darm (Healey et al. 2018). Zudem wurde in gemischten Kulturen von fäkalen Mikroorganismen durch Zugabe von Levan eine gesteigerte Wachstumsaktivität von *Faecalibacterium*-Spezies beobachtet (Adamberg et al. 2015). In dieser Arbeit konnte in Reinkulturen gezeigt werden, dass *F. duncaniae* neben scFOS auch längere I-FOS und L-FOS mit hoher Effizienz zum Wachstum nutzte. Außerdem metabolisierte *F. duncaniae* neben Inulin auch Levan zu großen Teilen.



Mao et al. (2015) berichteten, dass *R. gnavus* scFOS metabolisieren kann. In einer Mausstudie wurde zudem gezeigt, dass *R. gnavus* nach einer vierwöchigen Fütterung mit einer präbiotischen Mischung aus FOS, GOS und XOS angereichert wurde (Li et al. 2021b). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wies *R. gnavus* in dieser Arbeit ausgezeichnetes Wachstum auf den bakteriellen und pflanzlichen I-FOS auf. Darüber hinaus wurde erstmals gezeigt, dass *R. gnavus* auch L-FOS verstoffwechseln kann, während auf den Polymeren kein Wachstum erfolgte (Kapitel 3.7.2.4). Dies steht im Einklang mit zwei Studien, in denen nach der Einnahme von Inulin (Holscher et al. 2015) bzw. mit I-FOS angereichertem Inulin (Healey et al. 2018; Joossens et al. 2012) die Abundanz von *Ruminococcus* abnahm. In einer Interventions-Studie, bei der die Ernährung mit Inulin aus Agave ergänzt wurde, beobachtete man ebenfalls eine Reduktion von *Ruminococcus* (Holscher et al. 2015). Es gibt aber Hinweise darauf, dass einige *Ruminococcus* sp. Levan metabolisieren können oder aber im Darm durch Cross-Feeding-Mechanismen von anderen Darmbakterien profitieren, da in Kulturen von Stuhlproben das Wachstum von *Ruminococcus* durch die Supplementation mit Levan verstärkt wurde (Adamberg et al. 2015).

Die untersuchten Bacillota-Bakterien *A. rectalis* und *D. formicigenerans* wiesen eine nur begrenzte Fähigkeit zur Fructan-Degradation auf (Kapitel 3.7.2.4). Sheridan et al. (2016) analysierten die Genomsequenzen von vier *A. rectalis*-Stämmen auf das Vorhandensein von Genen, die für Proteine zur Synthese und zum Abbau von Kohlenhydraten kodieren. Dabei wurden zwei putative Fructan-gpPULs (Eub-3 und Eub-4) mit Genen für GH32-Enzyme und ABC-Oligosaccharid-Transportern sowie regulatorischen Elementen identifiziert. Während gpPUL Eub-3 in allen vier untersuchten *A. rectalis*-Stämmen nachgewiesen wurde, verfügten nur die Stämme *A. rectalis* DSM 17629 (auch in dieser Arbeit verwendet), ATCC33656 und M104/1 über das gpPUL Eub-4. Im Genom von *A. rectalis* T1-815 wurde somit ausschließlich das gpPUL Eub-3 identifiziert. Kultivierungen zeigten, dass *A. rectalis* M104/1 und T1-815 I-FOS ausgezeichnet verwerteten, wohingegen Inulin nur zu einer geringen Zunahme der Zelldichte führte. Trotz des Nachweises der zwei putativen Fructan-gpPULS wies der auch in dieser Arbeit verwendete Stamm (DSM 17629) im Gegensatz dazu nur geringfügiges Wachstum auf I-FOS und fast kein Wachstum auf Inulin auf (Sheridan et al. 2016). Dies steht im Einklang mit den Wachstumsversuchen dieser Arbeit, bei denen ausschließlich die Metabolisierung von I-FOS zu beobachten war. Hierbei fiel auf, dass die Supplementation mit den bakteriellen I-FOS zu einer deutlich höheren Wachstumsrate führte als die Verwendung von pflanzlichen I-FOS aus Chicorée. Auch Desai et al. (2016) berichteten, dass *A. rectalis* (DSM 17629) kurzketziges Inulin nur in geringem Maße nutzen kann, während kein Wachstum auf Levan beobachtet wurde. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass *A. rectalis* nicht in der Lage ist, L-FOS zu metabolisieren, was darauf hinweist, dass *A. rectalis* sehr spezifisch  $\beta$ -2,1-verknüpfte FOS nutzt.

Im Einklang mit der Literatur konnte bestätigt werden, dass *D. formicigenerans* nicht in der Lage ist, die Polymere Inulin (Taras et al. 2002) und Levan zu verwerten (Adamberg et al. 2015). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *D. formicigenerans* auch die pflanzlichen I-FOS nicht metabolisieren konnte (Kapitel 3.7.2.4). Wachstum erfolgte nur in Kulturen, die mit den bakteriellen I-FOS supplementiert waren. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass L-FOS nicht metabolisiert werden konnten. Somit wurde für *D. formicigenerans* nachgewiesen, dass das Bakterium über einen Abbaumechanismus verfügt, der spezifisch für  $\beta$ -2,1-verknüpfte FOS des GFn-Typs ist.

#### 4.3.4 Untersuchungen von *C. intestinalis* und *C. leptum* im Hinblick auf Fructan-Verwertung

Lediglich zwei der in den Wachstumsversuchen verwendeten Darmbakterien, *C. intestinalis* und *C. leptum*, konnten keines der Fructane zum Wachstum nutzen. Tatsächlich wird die Gattung *Collinsella* mit einer Ballaststoff-armen Ernährung in Verbindung gebracht (Adamberg et al. 2020; Gomez-Arango et al. 2018). Allerdings scheinen andere *Collinsella*-Spezies durchaus in der Lage zu sein, Fructane zu verwerten. So wurde von einer Anreicherung von *Collinsella*-Bakterien durch die Supplementation mit Levan (Adamberg et al. 2018; Adamberg et al. 2015; Liu et al. 2020) und Butyl-FOS (Kang et al. 2020) berichtet. Bei Küken führte die Fütterung eines I-FOS-haltigen Synbiotikums während der Aufzucht zu einer vermehrten Anzahl an *Collinsella*-Bakterien (Brugaletta et al. 2020).

Die Beobachtung, dass *C. leptum* keines der Fructane metabolisieren konnte, steht im Einklang mit den Beobachtungen von Gómez-García et al. (2022), die berichteten, dass die Kultivierung einer Stuhlprobe mit I-FOS aus Chicorée nicht zu einer Anreicherung mit *C. leptum* führte.

#### 4.3.5 Assoziation der untersuchten Bakterien mit der menschlichen Gesundheit

Die in dieser Arbeit untersuchten Bakterien kommen sehr häufig und teilweise in hohen Mengen im Darm gesunder Menschen vor (Cui et al. 2022; Duncan et al. 2002; Frank et al. 2007; Hold et al. 2002; Kraal et al. 2014; Lopetuso et al. 2013; Manson et al. 2008; Qin et al. 2010). Viele dieser Darmbakterien weisen veränderte Zellzahlen bei verschiedenen Krankheitszuständen auf, was darauf hindeutet, dass trotz ihrer grundsätzlich kommensalen Natur Verbindungen zu Krankheiten bestehen. Gleichzeitig erwecken einige dieser Mikroorganismen aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften großes Interesse. Die abundant vorkommenden Bakterien des Phylums Bacteroidota werden als Quelle nützlicher Enzyme und mikrobieller Therapeutika betrachtet (Grondin et al. 2017) und einige Mitglieder der Bacteroidota und Clostridiales werden

als Probiotika der nächsten Generation bezeichnet (O'Toole et al. 2017; Tan et al. 2019). In Übereinstimmung mit anderen Studien (Adamberg et al. 2015; Mao et al. 2015; Scott et al. 2014) wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl Darmbakterien mit gesundheitsfördernden Effekten als auch solche, die mit verschiedenen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht werden, von Fructanen des Inulin- und Levan-Typs in ihrem Wachstum beeinflusst werden.

*F. duncaniae*, *B. xylanisolvens*, *P. vulgatus* und *A. rectalis* gehören zu den Bakterien, die zurzeit als gesundheitsfördernd angesehen werden und verschiedene Fructane zum Wachstum nutzen konnten (Kapitel 3.7.2). Die Gattung *Faecalibacterium* wird derzeit als eine der wichtigsten kommensalen Gattungen für die menschliche Gesundheit angesehen (Lopez-Siles et al. 2017; Martín et al. 2018) und ihre Mitglieder werden als Kandidaten für die Entwicklung von diagnostischen, prognostischen, präventiven oder biotherapeutischen Ansätzen in Betracht gezogen (Verstraeten et al. 2023). Nach der neuesten phylogenetischen Analyse besteht die Gattung *Faecalibacterium* aus sechs Arten, wobei *F. prausnitzii* am bekanntesten für seine Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit ist. Der am besten untersuchte Stamm, *F. prausnitzii* DSM 17677 (der in dieser Arbeit analysiert wurde), wurde kürzlich neu klassifiziert und der Art *F. duncaniae* sp. nov. zugeordnet (Sakamoto et al. 2022; Tanno et al. 2023). *F. duncaniae* werden exzellente anti-inflammatorische Eigenschaften, sowie die Produktion von Butyrat zugeschrieben (Martín et al. 2018; Sakamoto et al. 2022). Studien haben eine verringerte Abundanz von *F. duncaniae* bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (Lopez-Siles et al. 2016; Sokol et al. 2008), infektiöser Colitis und IBD (Sokol et al. 2009) gezeigt. In Experimenten an Mausmodellen produzierte *F. duncaniae* ein anti-inflammatorischen Molekül und löste eine hohe IL-10-Produktion aus, was zu einem anti-inflammatorischen Effekt und der Linderung von Colitis führte (Almeida et al. 2020; Rossi et al. 2005). Zytologische Experimente zeigten außerdem, dass *F. duncaniae* die Ovalbumin-spezifische T-Zell-Proliferation verstärkte und IFN- $\gamma$  reduzierte, was zu entzündungshemmenden Effekten führte (Almeida et al. 2020).

Ein weiteres vielversprechendes Darmbakterium, welches als Biotherapeutikum in Betracht gezogen wird und durch Fructane in seinem Wachstum gefördert werden konnte, ist *B. xylanisolvens* (Ulsemer et al. 2012). Die Abundanz von *B. xylanisolvens* war in Patienten mit Gicht zwar erhöht (Guo et al. 2016), im Gegensatz dazu war die Häufigkeit von *B. xylanisolvens* in Menschen mit Atherosklerose reduziert und negativ mit Typ-1-Diabetes in Kindern korreliert (Liu et al. 2021). Zusätzlich wies die Arbeit von Qiao et al. (2020) darauf hin, dass *B. xylanisolvens* therapeutisches Potential bei der Linderung von nichtalkoholischer Fettlebererkrankung hat, da die Verabreichung dieses Organismus an Mäuse Lebersteatose reduzierte und Folat-vermittelte

Signalwege förderte. Es wurde gezeigt, dass Hitze-inaktivierte *B. xylanisolvens*-Zellen sicher für den menschlichen Verzehr sind und ihre Einnahme zu einem erhöhten Level an TF $\alpha$ -spezifischen IgM-Antikörpern führt, was möglicherweise das Krebsrisiko reduzieren könnte (Ulsemer et al. 2016).

*P. vulgatus* ist ein weit verbreitetes mutualistisches Bakterium, das vermutlich verschiedene gesundheitliche Vorteile vermittelt (Xu et al. 2023). So wurde eine inverse Korrelation zwischen *P. vulgatus* und koronarer Herzkrankheit (Yoshida et al. 2018) sowie Dickdarmkrebs (Wang et al. 2012) festgestellt. Darüber hinaus war *P. vulgatus* an der Linderung von inflammatorischen Erkrankungen beteiligt, die durch *E. coli* (Waidmann et al. 2003) und *Yersinia enterocolitica* (Frick et al. 2007) ausgelöst wurden. Zudem milderte die orale Verabreichung von *P. vulgatus* an Ratten Fettstoffwechselstörungen (Xu et al. 2023). Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise darauf, dass ein Überschuss an Proteasen aus *P. vulgatus* für die Pathologie und Behandlung von Colitis ulcerosa relevant sein könnte (Mills et al. 2022).

Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass *A. rectalis* einen positiven Einfluss auf die menschliche Gesundheit ausüben könnte. So ist *A. rectalis* negativ mit SARS-CoV-2 korreliert (Zuo et al. 2020). Darüber hinaus hemmt *A. rectalis* Lymphomagenese (Lu et al. 2022) und milderte die systemische Entzündung bei der durch das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 ausgelösten Behçet-Krankheit (Islam et al. 2021).

Die Ergebnisse aus Assoziationsstudien bezüglich der Mehrheit der untersuchten Darmbakterien, die Fructane des Inulin- und Levan-Typs nutzen konnten, sind widersprüchlich und weisen sowohl auf positive als auch negative Korrelationen mit Erkrankungen hin. Beispielsweise ist die Bedeutung von *S. copri* für die menschliche Gesundheit stark umstritten (Fehlner-Peach et al. 2019; De Filippis et al. 2019). *S. copri* wurde mit inflammatorischen Zuständen (De Filippis et al. 2019), Insulin-Resistenz und Glucose-Intoleranz (Pedersen et al. 2016) in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Häufigkeit von *S. copri* in einigen Patienten mit nicht behandelte rheumatoide Arthritis festgestellt (Maeda et al. 2016; Scher et al. 2013). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass *S. copri* im Darm von Menschen mit nicht-westlichem Lebensstil, wie beispielsweise indigenen Völkern Afrikas und Südamerikas, mit besonders hoher Prävalenz vorkommt (De Filippo et al. 2010; Hansen et al. 2019; Obregon-Tito et al. 2015; Schnorr et al. 2014; Smits et al. 2017; Vangay et al. 2018; Yatsunencko et al. 2012). In industrialisierten Gesellschaften scheint *S. copri* hingegen unterrepräsentiert zu sein (Tett et al. 2019; Vangay et al. 2018). Ein nicht-westlicher Lebensstil umfasst neben anderen Faktoren eine Ernährung, die auf unverarbeiteten, agrarischen und ballaststoffreichen Nahrungsmitteln basiert (Kovatcheva-Datchary 2022; Tett et al. 2019). Die erhöhte Abundanz von *S. copri* in Gesellschaften, die sich

traditioneller und im Vergleich zur üblichen westlichen Ernährung gesünder ernähren, deutet möglicherweise auf die gesundheitlichen Vorteile von *S. copri* hin (Tett et al. 2019). Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die *S. copri* mit einem verbesserten Glucose-Metabolismus, verbesserter Insulin-Sensitivität (De Vadder et al. 2016) und einem generellen anti-inflammatorischen Effekt (De Angelis et al. 2015; Vitaglione et al. 2015) in Verbindung brachten. Außerdem wurde bei Mäusen mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) eine geringere Abundanz von *S. copri* festgestellt und die Behandlung von PSC-Mäusen mit *S. copri* linderte die Leberfibrose und Gallenstauung der Mäuse (Jiang et al. 2022). Erste Versuche im Mausmodell ergaben, dass die Verabreichung von *S. copri* keinen nachteiligen Effekt auf Wachstum, zelluläre Blutkomponenten, biochemische Serumparameter und lebenswichtige Organe hatte, und auch keine starke immunmodulierende Wirkung aufwies (Verbrugghe et al. 2021). Aufgrund dieser positiven Eigenschaften sehen einige Wissenschaftler *S. copri* trotz der Assoziationen mit Erkrankungen als Kandidat für ein Probiotikum der nächsten Generation an (Verbrugghe et al. 2021).

Sowohl in menschlichen Patienten als auch in Mäusen, die einer kombinierten Immun-Checkpoint-Blockade zur Krebsbekämpfung unterzogen wurden, wurde eine erhöhte Abundanz von *B. intestinalis* festgestellt (Andrews et al. 2021). In dieser Studie wurde *B. intestinalis* auch mit Intestinaler-Toxizität in Verbindung gebracht, vermutlich aufgrund der Induktion der *Il1b*-Expression im Ileum (Andrews et al. 2021). Andererseits wurde gezeigt, dass *B. intestinalis* beim Abbau von Arabinoxylan Ferulasäure produziert, die die Wirts-Immunantwort verstärkte (Yasuma et al. 2021). Außerdem wurde *B. intestinalis* als eine von 21 Bakterien-Spezies identifiziert, die nach einer Antibiotikatherapie bei der ökologischen Erholung des Darms eine Rolle spielen (Chng et al. 2020).

*Parabacteroides* spp. sind ebenfalls mit verschiedenen Krankheiten assoziiert (Cui et al. 2022). Eine gesteigerte Abundanz von *P. johnsonii* wurde bei Patienten mit der durch T-Zellen vermittelten Autoimmunkrankheit Alopecia Areata (Moreno-Arrones et al. 2020) sowie bei nicht-alkoholischer Steatohepatitis beobachtet (Wong et al. 2013). Andererseits wurden in anderen Studien gesundheitsförderliche Effekte von *P. johnsonii* festgestellt. Eine Studie von Tanoue et al. (2019) weist darauf hin, dass *P. johnsonii* das Potenzial besitzt, die Immunreaktion des Wirts zu regulieren. Die Besiedlung von keimfreien Mäusen mit einer Mischung aus *P. johnsonii*, *P. distasonis*, *P. gordonii* und acht weiteren Bakterienstämmen, die aus Stuhlproben gesunder Spender isoliert wurden, führte zu einer Induktion von CD8 T-Zellen im Darm, stärkte die anti-Tumor-Immunantwort und erhöhte die Widerstandsfähigkeit des Wirts gegen Infektionen mit *Listeria monocytogenes* (Tanoue et al. 2019). Zudem wurde beobachtet, dass die Häufigkeit von *P. johnsonii* negativ mit dem Reizdarmsyndrom und den damit verbundenen Symptomen

korreliert und dass nach einer Fäkalen Mikrobiota-Transplantation die Häufigkeit von *P. johnsonii* zunimmt (El-Salhy 2023).

*D. formicigenerans* und *R. gnavus* besiedeln bereits im Säuglingsalter den Darm und tragen zur gesunden Entwicklung der Darmmikrobiota sowie zum gesunden Wachstum und Metabolismus der Säuglinge bei (Blanton et al. 2016; Sagheddu et al. 2016). Für einen positiven Einfluss von *D. formicigenerans* auf die Gesundheit spricht ebenfalls, dass das Bakterium negativ mit IBD (Lu et al. 2020) und in SARS-CoV-2 (Zuo et al. 2020) korreliert ist. Im Gegensatz dazu ist eine höhere Abundanz von *Dorea*-Bakterien mit Multipler Sklerose (Vacca et al. 2020), Übergewicht (Companys et al. 2021) und Psoriasis (Shapiro et al. 2019) assoziiert.

Eine erhöhte relative Häufigkeit von *R. gnavus* im Erwachsenenalter wird mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter IBD (Crost et al. 2023), Morbus Crohn (Crost et al. 2023), koronare Herzkrankheit (Toya et al. 2020) und post-akutes COVID-19-Syndrom (Liu et al. 2022). Es wurden einige Stamm-spezifische molekulare Mechanismen identifiziert, die möglicherweise an der Assoziation zwischen *R. gnavus* und Erkrankungen beteiligt sind (Crost et al. 2023). Unter anderem wurde gezeigt, dass *R. gnavus* ein inflammatorisches Glucorhamnan-Polysaccharid sekretiert, welches den proinflammatorischen Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induziert (Henke et al. 2019). Außerdem ist *R. gnavus* an der Synthese von sekundären Gallensäuren beteiligt, die mit der Entzündung bei Patienten mit IBD assoziiert sind (Crost et al. 2023).

Nicht durch Fructane in ihrem Wachstum gefördert wurden *C. leptum* und *C. intestinalis*. *C. leptum* ist Namensgeber des heterogenen Clostridium Cluster IV (*C. leptum*-Gruppe), dem außerdem die Bakterien *C. sporosphaeroides*, *C. cellulosi* und *F. prausnitzii/duncaniae* angehören (Grenda et al. 2022). Der *C. leptum*-Gruppe wird die Produktion von SCFAs zugesprochen, ebenso wie die Beteiligung an der Fermentation von Ballaststoffen in Zusammenarbeit mit anderen Darmbakterien (Grenda et al. 2022). Die meisten Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der *C. leptum*-Gruppe und Gesundheit/Ernährung haben sich allerdings auf *Faecalibacterium* sp. konzentriert (Grenda et al. 2022) oder beziehen sich auf die *C. leptum*-Gruppe als Gesamtheit (Guo et al. 2020). So wird angenommen, dass die *C. leptum*-Gruppe eine positive Wirkung auf die Darmgesundheit und die -Besiedlung hat (Guo et al. 2020). In einer Untersuchung von Li et al. (2022) wurde festgestellt, dass die Kokultivierung von *C. leptum* und *Saccharomyces boulardii* das Wachstum der probiotischen Hefe förderte und zu einer gesteigerten SCFA-Produktion führte. Weitere Studien, die den Einfluss der Spezies *C. leptum* auf die Gesundheit direkt beleuchten, fehlen.

*C. intestinalis* war das einzige dem Phylum Actinomycetota zugehörige Bakterium, welches in dieser Arbeit untersucht wurde. *C. intestinalis* wird sowohl mit Krankheit als auch mit Gesundheit assoziiert. Es gibt Hinweise darauf, dass eine erhöhte Abundanz von *C. intestinalis* mit Fettleibigkeit (Gomez-Arango et al. 2018), Typ-2-Diabetes (Lambeth et al. 2015) und rheumatischer Arthritis (Chen et al. 2016b) assoziiert ist. Zudem haben gnotobiotische Modelle gezeigt, dass die Verabreichung von *Collinsella*-Bakterien die intestinale Permeabilität erhöhen kann (Gomez-Arango et al. 2018). Im Gegensatz dazu ist eine durch *Collinsella*-Bakterien und Bifidobakterien dominierte Darmmikrobiota in den ersten sechs Lebensmonaten von Säuglingen mit einer langen Schwangerschaft, Vaginalgeburt und typischer Adipositas mit 18 Monaten assoziiert (Dogra et al. 2015). Darüber hinaus wird *C. intestinalis* als ein potenzieller Kandidat zur Behandlung von IBD betrachtet, da bei Kindern mit neu auftretender IBD eine geringere Besiedlung des Zwölffingerdarms mit *Collinsella*-Bakterien beobachtet wurde (Saalman et al. 2018). Die Auswirkungen von *C. intestinalis* könnten mit der Fähigkeit von *Collinsella* zusammenhängen, die Konzentrationen von Gallensäure und Plasma-Cholesterol zu modulieren (Lahti et al. 2013).

#### **4.3.6 Präbiotisches Potential der synthetisierten bakteriellen I-FOS, L-FOS und Levan**

Die Verstoffwechslung von Kohlenhydrat-basierten Präbiotika erfordert aufgrund ihrer variierenden chemischen Strukturen eine hohe Spezialisierung (Sabater et al. 2021). Tatsächlich können einige der Saccharide nur von einer begrenzten Anzahl von Mikroorganismen direkt genutzt werden, während weitere Spezies innerhalb der Mikrogen-Population durch Cross-Feeding-Mechanismen von diesen Präbiotika ebenfalls profitieren können (Sabater et al. 2021). Somit hängt die Modulation des Darmmikrobioms durch Präbiotika von ihren strukturellen Merkmalen, wie dem Polymerisationsgrad, der Verzweigung, der Art der glykosidischen Bindung und der Monosaccharid-Komposition ab (Lam und Cheung 2019). Wenn in Zukunft tiefergehender erschlossen werden kann, wie die Mikrobiota durch die unterschiedlichen Präbiotika moduliert wird, könnten diese Verbindungen anhand ihrer Struktur und auf die Bedürfnisse des Patienten angepasst ausgewählt werden (Lam und Cheung 2019).

Levan und L-FOS sind vielversprechende Präbiotika-Kandidaten, allerdings sind weitere Untersuchungen zu ihrer präbiotischen Wirkung notwendig (Adamberg et al. 2015). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Levan zahlreiche gesundheitsförderliche biologische Aktivitäten aufweist, darunter anti-tumorale und blutdrucksenkende Eigenschaften (Liu et al. 2020). Zudem wurde gezeigt, dass Levan und L-FOS eine modulierende Wirkung auf die humane

Darmmikrobiota haben (Adamberg et al. 2015). In Kulturen von menschlichen Stuhlproben, wurde das Wachstum von *Bifidobacterium*, *A. rectalis* und der *Clostridium-coccoides*-Gruppe, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Erysipeltrichaceae* und *Eubacterium* durch diese Fructane stimuliert (Adamberg et al. 2015; Liu et al. 2020).

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass einige kommensale Darmbakterien in der Lage sind, Levan und L-FOS zu metabolisieren. Levan förderte ausschließlich das Wachstum von *B. intestinalis*, *F. duncaniae* und *S. copri*, wohingegen die L-FOS zusätzlich von *R. gnavus*, *P. vulgatus* und *B. xylanisolvens* genutzt werden konnten. Somit wurden mit Levan und L-FOS im Vergleich zu den untersuchten Fructanen des Inulin-Typs das Wachstum von einer geringeren Anzahl an Bakterien gefördert. Dies steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Wachstumsversuchen mit Darmbakterien (Desai et al. 2016; Colnet et al. 2021). Zudem konnten lediglich *F. duncaniae* und *S. copri* zusätzlich auch das polymere Inulin zum Wachstum nutzen. Neben einigen Bakterien wie *F. duncaniae* und *S. copri*, die sowohl von Inulin- als auch Levan-artigen Fructanen in ihrem Wachstum gefördert werden, wird demnach mit den Levan-artigen Fructanen eine andersartige Mikrobiota-Modulation erzielt als mit den Inulin-basierten Präbiotika. Darüber hinaus hat Levan im Vergleich zu Inulin und FOS eine höhere Verweildauer im Darm, was die Verträglichkeit bei empfindlichen Personen erhöht (Liu et al. 2020). Die langsamere Fermentation im Darm, die Wachstumsstimulation anderer Bakterien und die höhere Selektivität Levan-artiger Fructane im Vergleich zu Inulin-artigen Fructanen könnte für einige Patienten von Vorteil sein.

Die Wachstumsversuche zeigten, dass die in dieser Arbeit mit InuGB-V3 synthetisierten I-FOS bei einigen Bakterien (*R. gnavus*, *A. rectalis*, *D. formicigenerans* und *P. johnsonii*) ein stärkeres Wachstum bewirkten als die pflanzenbasierten I-FOS und andere Fructane.

Vermutlich ist die GFn-Struktur der bakteriellen I-FOS für die stärkere Wachstumsförderung verantwortlich. In einer Studie von Wang et al. (2020) wiesen scFOS mit endständiger Glucose einen stärkeren bifidogenen Effekt auf als pflanzenbasierte I-FOS (primär Fn-Typ). Darüber hinaus wurde bei einigen *Bifidobacterium*- und *Lactobacillus*-Spezies eine hohe Spezifität für I-FOS des GFn-Typs festgestellt (Boger et al. 2018; Goh und Klaenhammer 2015). Die zur I-FOS-Metabolisierung notwendigen Gene sind in Bifidobakterien in einem Operon organisiert. Dieses Operon wird offenbar von Saccharose und GFn-Typ I-FOS, nicht jedoch von I-FOS des Fn-Typs induziert (Goh und Klaenhammer 2015). Darüber hinaus hydrolysierte die  $\beta$ -Fructofuranosidase aus *Bifidobacterium breve* die  $\beta$ -2,1-Verknüpfungen zwischen der Glucose- und Fructose-Einheiten in Saccharose und scFOS, aber nicht die  $\beta$ -2,1-Bindungen zwischen den Fructose-Einheiten im gleichen Substrat, sodass ein großer Teil des Substrates nicht verwertet werden



konnte (Ryan et al. 2005). Saulnier et al. (2007) zeigten, dass *L. plantarum* ausschließlich auf GFn-Typ I-FOS wächst, wobei die kurzkettigen I-FOS präferiert werden. Das probiotische Milchsäurebakterium *L. salivarius* ist sogar spezifisch für 1-Kestotriose, längere I-FOS und Inulin werden von dem Bakterium nicht verwertet (Boger et al. 2018). In beiden *Lactobacillus*-Spezies wurde ein Saccharose-PTS im Genom nachgewiesen, über das neben Saccharose auch die GFn-Typ I-FOS ins Zellinnere aufgenommen werden (Boger et al. 2018; Saulnier et al. 2007). Die Kapazität und Spezifität der Saccharose-PTS für I-FOS sind demnach sehr eng (Saulnier et al. 2007). Welche Enzyme bei der Fructan-Verstoffwechslung für die bessere Verwertung der bakteriellen I-FOS in *R. gnavus*, *A. rectalis*, *D. formicigenerans* und *P. johnsonii* verantwortlich ist, bleibt zu untersuchen. Die überlegenen wachstumssteigernden Eigenschaften der I-FOS (InuGB-V3) gegenüber den anderen Fructan-Substraten eröffnen jedoch die Möglichkeit, die bakteriellen I-FOS gezielt zur starken Stimulation spezifischer Darmbakterien einzusetzen. Weiterhin ist es von Interesse, wie die bakteriellen I-FOS (InuGB-V3) im Vergleich zu scFOS von Darmbakterien verwertet werden. Die bakteriellen I-FOS enthalten einige längere Moleküle als scFOS. Aufgrund dessen könnten die bakteriellen I-FOS (InuGB-V3) eine andere Mikrobiota-Modulation bewirken als scFOS, die unter Umständen von Vorteil sein könnte.

#### **4.4 Die Bedeutung individueller Reaktionen auf Präbiotika und zukünftige Anwendungsperspektiven**

Für die erfolgreiche Modulation der Darmmikrobiota mittels Präbiotika zur Prävention und unterstützenden Behandlung von Krankheiten ist eine wirksame Strategie von entscheidender Bedeutung. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass Unterschiede in der Zusammensetzung und Funktionalität der Darmmikrobiota zu Beginn der präbiotischen Intervention entscheidend für die beobachteten heterogenen, interindividuellen Reaktionen auf Präbiotika sind (Gibbons et al. 2022).

Viele relevante Funktionen der Darmmikrobiota, wie die Fähigkeit zum Fructan-Abbau, sind Stamm-spezifisch (De Filippis et al. 2019; Krumbeck et al. 2016). Da der Darm von Mensch zu Mensch von unterschiedlichen Bakterien-Spezies und -Stämmen besiedelt wird, gibt es interindividuelle Unterschiede in der Funktionalität des Mikrobioms (Joglekar et al. 2018). Diese taxonomische und funktionelle Variabilität führt wahrscheinlich zu den unterschiedlichen Reaktionen auf Ernährungsinterventionen (Krumbeck et al. 2016).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie bestätigte die Bedeutung der individuellen Ausprägung für die Reaktion auf Präbiotika. In dieser Drei-Wege-Crossover-Studie erhielten gesunde Erwachsene, im Gegensatz zu den gängigen Studien im parallelen Design, drei Präbiotika (Inulin, GOS und Dextrin) in Folge. Es stellte sich heraus, dass die Stoffwechsel- und SCFA-Reaktion stärker von den Individuen abhing als von der Wahl des Präbiotikums (Holmes et al. 2022). Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, dass individuell zugeschnittene präbiotische Therapien auf Grundlage der Analyse vom Patienten und deren Mikrobiota entwickelt werden könnten (Holmes et al. 2022). Bei einem personalisierten Ansatz würden auf Basis genetischer und funktioneller Unterschiede zwischen Bakterien-Arten und -Stämmen individualisierte Vorhersagen über die Reaktion der Mikrobiota auf bestimmte Nahrungspolysaccharide getroffen werden (Sonnenburg et al. 2010). Auf diese Weise könnten zum einen Personen identifiziert werden, die von einer präbiotischen Intervention profitieren könnten (Responder), und zum anderen könnte das am besten geeignete Präbiotikum für jeden einzelnen Patienten empfohlen werden (Holmes et al. 2022).

Im Zuge wachsenden Interesses werden zunehmend Konzepte für solche individuellen, auf die Mikrobiota ausgerichteten Ernährungstherapien entwickelt (Fan et al. 2023; Lam und Cheung 2019), da angenommen wird, dass die Integration von Mikrobiom-Profilen in die Patientenversorgung schnellere, genauere und weniger invasive klinische Entscheidungsprozesse ermöglichen wird (Dey 2017). In diesem Zusammenhang werden Präbiotika eine wichtige Rolle für die individuelle Anpassung von Ernährungsinterventionen spielen, um die Darmmikrobiota in eine für die Krankheitsprävention günstigere Konfiguration zu bringen (Dey 2017).

Damit personalisierte Therapien realisiert werden können, müssen jedoch noch viele Wissenslücken geschlossen werden (Dey 2017). Das Verständnis darüber, wie individuelle Unterschiede in der Darmmikrobiota die biologischen Auswirkungen von Ernährungsinterventionen beeinflussen, ist noch sehr begrenzt (Gibbons et al. 2022). Um ein prognostisches Mikrobiom-Modell zu erstellen, müssten neben dem geografischen Standort, Lebensstil, Ernährungsgeschichte und SCFA-Ausgangskonzentration (Dey et al. 2017; Holmes et al. 2022) auch Daten zur Zusammensetzung, Abundanz, Metagenomik, Meta-Transkriptomik und Metabolomik der Darmmikrobiota erfasst werden (Zmora et al. 2016). Gensequenzen, die die Stoffwechsellkapazitäten der Bakterien unterscheiden, wie beispielsweise FOS-Transportsysteme (Wang et al. 2020) oder PULs (Colnet et al. 2021), könnten als Biomarker in mikrobiologischen Datensätzen dienen (Sonnenburg et al. 2010). Allerdings stellen unvollständige mikrobielle Genom-Datenbanken, fehlende funktionelle Annotationen der meisten mikrobiellen Gene und das begrenzte Wissen über die Regulation der transkriptomischen und translationalen Aktivitäten

des Mikrobioms große Herausforderungen dar (Fan und Pederson 2021). Unser derzeitiges Wissen darüber, wie die Mikrobiota von externen Faktoren beeinflusst wird, basiert hauptsächlich auf niedrig aufgelösten Daten (Gattungs-Ebene) und unvollständigen Funktionsvorhersagen (Joglekar et al. 2018; De Filippis et al. 2019). Wahrscheinlich ist es notwendig, eine höhere Auflösung der metagenomischen Daten auf Stamm-Ebene zu generieren, um die kausalen Zusammenhänge zwischen der Mikrobiota und der menschlichen Gesundheit zu erkennen (De Filippis et al. 2019). Des Weiteren ist es von Bedeutung, die Struktur-Funktions-Beziehungen zwischen verschiedenen Präbiotika und mikrobiellen Spezies zu verstehen (Dey et al. 2017) und die mechanistischen Grundlagen der Mikrobiota-Funktion biochemisch zu charakterisieren (Sonnenburg et al. 2010; Wang et al. 2020). Da personalisierte, prädiktive Mikrobiom-Modelle und praktikable Interventionsstrategien sehr vielversprechende Instrumente zur Linderung von Krankheiten sind (Dey 2017; Gibbons et al. 2022), ist ihre Entwicklung ein wichtiges Ziel in den Gesundheits- und Ernährungswissenschaften des 21. Jahrhunderts (Gibbons et al. 2022).

Präbiotika bergen ein enormes Potenzial, die Darmmikrobiota zur Prävention oder Behandlung von verschiedenen Erkrankungen zu modulieren (Fan und Pedersen 2021). Allerdings sollte im Hinblick auf die negativen Auswirkungen, die Kohlenhydrat-basierte Präbiotika bei einigen Personengruppen hervorrufen können, die allgemeine Empfehlung zum Verzehr hoher Mengen dieser Präbiotika als Nahrungsergänzungsmittel, sowie der vermehrte Einsatz dieser Ballaststoffe in verarbeiteten Lebensmitteln aus wirtschaftlichen Gründen, überdacht werden. Vielmehr wird es in Zukunft entscheidend sein, neben den kollektiven Wirkungen von Präbiotika auch individuelle Abweichungen in der Reaktion zu berücksichtigen, um individuelle Maßnahmen entwickeln zu können (Dey 2017). Dank des zunehmenden Verständnisses der Zusammenhänge zwischen der Biologie des Wirts und der Mikrobiota, könnte die Forschung bald in der Lage sein, genomische, mikrobiomische und patientengeschichtliche Daten für personalisierte präbiotische Interventionen zu nutzen (Sonnenburg et al. 2010) und somit die zahlreichen gesundheitlichen Vorteile von Präbiotika voll auszuschöpfen.

## 5 Zusammenfassung

Aufgrund der gesundheitsfördernden Wirkung sowie einigen nützlichen funktionellen Eigenschaften haben I-FOS in der Lebensmittelindustrie und im medizinischen Bereich enorm an Bedeutung gewonnen, weshalb erhebliches wirtschaftliches Interesse an der Synthese von I-FOS besteht. Allerdings beschränken die hohen Produktionskosten die breitere Anwendung von I-FOS. Daher besteht weiterhin Bedarf an neuen biotechnologischen Produktionsstrategien. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich aus diesem Grund mit der Entwicklung eines alternativen enzymatischen Herstellungsprozesses für I-FOS aus Saccharose mit Hilfe der Inulosucrase InuGB-V3 aus *Lactobacillus gasser* DSM 20604.

- 1) Durch die heterologe Proteinproduktion der Inulosucrase in *E. coli* BL21 konnte eine sehr hohe Protein- und volumetrische Aktivitätsausbeute von  $139 \pm 19$  mg InuGB-V3 bzw.  $120.000 \pm 11.000$  U pro L *E. coli* Kultur erreicht werden. In den I-FOS-Synthesereaktionen wurde das gereinigte Zellysat (InuGB-V3-Rohenzym) als Biokatalysator eingesetzt, um teure Enzymreinigungsschritte zu umgehen und so die Wirtschaftlichkeit des Herstellungsprozesses zu verbessern.
- 2) Zur Analyse der synthetisierten I-FOS wurde eine HPLC-Methode optimiert und validiert, die alle Vorteile des isokratischen HPLC-Messmodus mit dem Nachweis von kurz- und langkettigen I-FOS kombinierte. Unter Verwendung der Aminophasensäule Eurospher II 100 NH2 (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) mit 60 % [v/v] Acetonitril bei  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  wurden I-FOS mit einem Polymerisierungsgrad (DP) von 3-17 in weniger als 45 Minuten basisliniengetrennt eluiert. Aus diesem Grund stellt die Methode eine nützliche Verbesserung gegenüber bestehenden isokratischen HPLC-Verfahren dar.
- 3) Durch die Charakterisierung des InuGB-V3-Rohenzym und der darauf basierenden Optimierung der grundlegenden Prozessparameter konnten die Produktausbeute und die Effizienz des Prozesses gesteigert werden. Die Zugabe von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , ein pH-Wert von 3,5-5,5 und eine Inkubationstemperatur von  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  erwiesen sich als optimale Produktionsparameter, bei denen das InuGB-V3-Rohenzym hohe Umsatzraten, geringe Saccharose-Hydrolyse und eine ausgezeichnete Stabilität über 4 Tage zeigte. Die Erhöhung der Substratkonzentration bis zur Löslichkeitsgrenze ( $800 \text{ g L}^{-1}$ ) ermöglichte eine Steigerung der I-FOS-Konzentration und die Synthese von Produkten mit niedrigem DP bei gleichzeitiger Verringerung der Saccharose-Hydrolyse.
- 4) In der optimierten Biokonversions-Reaktion mit  $800 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose wurden I-FOS mit einem DP von 3-11 synthetisiert. Das vorherrschende Transfructosylierungs-Produkt war

1,1-Kestotetraose (DP4) mit einer Konzentration von  $125,6 \pm 8,1 \text{ g L}^{-1}$ . Produkte mit einem DP  $> 6$  waren nur in geringen Mengen vorhanden. Die erzielte I-FOS-Konzentration von  $401 \pm 7 \text{ g L}^{-1}$  und die I-FOS-Ausbeute von  $0,5 \pm 0,1 \text{ g I-FOS pro g Saccharose}$  sind die bisher höchsten für eine bakterielle Inulosucrase beschriebenen Werte und zeigen die Wettbewerbsfähigkeit des entwickelten Produktionsverfahrens im Vergleich zu bestehenden Verfahren mit Enzymen aus Pilzen auf. Neben I-FOS enthielt der Produktsirup  $249,2 \pm 11,2 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Produkt der InuGB-V3 Reaktion. Zudem wurden geringe Mengen an Saccharose als Restsubstrat ( $79,7 \pm 11,4 \text{ g L}^{-1}$ ), Fructose ( $18,5 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ ) aus der Hydrolyse-Aktivität des Enzymes und Inulin ( $3,3 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ ) aus der Polymerisations-Aktivität von InuGB-V3 detektiert.

- 5) Der Großteil der in der Produktlösung verbliebenen hochkalorischen Zucker Glucose, Saccharose und Fructose wurde mit Aktivkohle entfernt. Dadurch konnten  $81 \pm 5 \%$  der ursprünglich eingesetzten I-FOS mit einer Reinheit von  $89 \pm 1 \%$  zurückgewonnen werden.

Die Metabolisierung von Fructanen durch die Darmmikrobiota ist noch nicht hinreichend untersucht und ein tiefergehendes Verständnis zur Wirkungsweise von Fructanen ist nötig, um die Verbindungen gezielt und mit dem gewünschten Resultat als Präbiotikum einzusetzen. Aus diesem Grund wurden im zweiten Teil dieser Arbeit polymere Fructane und FOS des Inulin- und Levan-Typs, einschließlich der zuvor produzierten und aufgereinigten I-FOS, als Substrate in Wachstumsversuchen mit häufig vorkommenden kommensalen Bakterien der menschlichen Darmmikrobiota eingesetzt.

- 1) Unter den untersuchten Bakterienstämmen waren lediglich *C. leptum* und *C. intestinalis* nicht in der Lage, die eingesetzten Fructane abzubauen. Die restlichen neun Bakterienstämme verwerteten mindestens eines der Fructane. *F. duncaniae* und *S. copri* demonstrierten besondere Fähigkeiten im Abbau der Fructane, da diese Spezies auf allen angebotenen Fructanen Wachstum zeigten.
- 2) Die I-FOS erwiesen sich als ein Substrat, welches von fast allen untersuchten Darmbakterien zum Wachstum genutzt wurde. Viele Darmbakterien konnten auch die L-FOS metabolisieren. Inulin und Levan wurden dahingegen nur von wenigen Darmbakterien verwertet. Zudem ermöglichten die FOS-Substrate in den meisten Fällen stärkeres Wachstum als die polymeren Fructane.
- 3) Bei der Kultivierung mit den zuvor mittels InuGB-V3 synthetisierten und aufgereinigten I-FOS zeigten *R. gnavus*, *A. rectalis*, *D. formicigenerans* und *P. johnsonii* stärkeres Wachstum als mit den anderen Fructanen. Diese überlegenen wachstumssteigernden Eigenschaften der in dieser Arbeit produzierten I-FOS gegenüber den anderen Fructanen eröffnen die Möglichkeit, die bakteriellen I-FOS gezielt zur starken Förderung bestimmter Darmbakterien einzusetzen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aburto, C., Guerrero, C., Vera, C., Wilson, L., Illanes, A. (2018):** Co-immobilized  $\beta$ -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells for the simultaneous synthesis and purification of galacto-oligosaccharides. *Enzyme Microb. Technol.*, 118:102–108.
- Adamberg, K., Adamberg, S., Ernits, K., Larionova, A., Voor, T., Jaagura, M., Visnapuu, T., Alamäe, T. (2018):** Composition and metabolism of fecal microbiota from normal and overweight children are differentially affected by melibiose, raffinose and raffinose-derived fructans. *Anaerobe*, 52:100–110.
- Adamberg, K., Jaagura, M., Aaspõllu, A., Nurk, E., Adamberg, S. (2020).** The composition of faecal microbiota is related to the amount and variety of dietary fibres. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 71(7):845–855.
- Adamberg, K., Tomson, K., Talve, T., Pudova, K., Puurand, M., Visnapuu, T., Alamäe, T., Adamberg, S. (2015):** Levan enhances associated growth of *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in fecal microbiota. *PLoS ONE*, 10(12): e0144042.
- Akbari, P., Fink-Gremmels, J., Willems, R.H.A.M., Difilippo, E., Schols, H.A., Schoterman, M.H.C., Garssen, J., Braber, S. (2017):** Characterizing microbiota-independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: insight into the role of structure and size. *Eur. J. Nutr.*, 56(5):1919–1930.
- Almeida, D., Machado, D., Andrade, J.C., Mendo, S., Gomes, A.M., Freitas, A.C. (2020):** Evolving trends in next-generation probiotics: a 5W1H perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60(11):1783–1796.
- Andrews, M.C., Duong, C.P.M., Gopalakrishnan, V., Lebba, V., Chen, W.-S., Derosa, L., Khan, M.A.W., Cogdill, A.P., White, M.G., Wong, M.C., Ferrere, G., Fluckiger, A., Roberti, M.P., Opolon, P., Alou, M.T., Yonekura, S. Roh, W., Spencer, C.N., Curbelo, I.F. Vence, L. et al. (2021):** Gut microbiota signatures are associated with toxicity to combined CTLA-4 and PD-1 blockade. *Nat. Med.*, 27(8):1432–1441.
- Antošová, M., Polakovič, M., Bálež, V. (1999):** Separation of fructooligosaccharides on a cation-exchange HPLC column in silver form with refractometric detection. *Biotechnol. Tech.*, 13(12):889–892.
- Anwar, M.A., Kralj, S., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2008):** The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(11):3426–3433.
- Anwar, M.A., Kralj, S., Piqué, A.V., Leemhuis, H., van der Maarel M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2010):**

- Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 156(4):1264–1274.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerbezem, M. Kurokawa, K. et al. (2011):** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346):174–180.
- Ávila-Fernández, Á., Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegría, M.E., Olvera, C., López-Munguía, A. (2016):** Functional characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans. *J. Appl. Microbiol.*, 121(1):263–276.
- Bakir, M.A., Kitahara, M., Sakamoto, M., Matsumoto, M., Benno, Y. (2006):** *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56(1):151–154.
- Baneyx, F. (1999):** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5):411–421.
- Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R., Klaenhammer, T.R. (2003):** Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(15):8957–8962.
- Barrangou, R., Azcarate-Peril, M.A., Duong, T., Connors, S.B., Kelly, R.M., Klaenhammer, T.R. (2006):** Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(10):3816–3821.
- Baxter, N.T., Schmidt, A.W., Venkataraman, A., Kim, K.S., Waldron, C., Schmidt, T.M. (2019):** Dynamics of human gut microbiota and short-chain fatty acids in response to dietary interventions with three fermentable fibers. *MBio*, 10(1):10–1128.
- Blanton, L.V., Charbonneau, M.R., Salih, T., Barratt, M.J., Venkatesh, S., Ilkaveya, O., Subramanian, S., Manary, M.J., Trehan, I., Jorgensen, J.M., Fan, Y.-M., Henrissat, B., Leyn, S.A., Rodionov, D.A., Osterman, A.L., Maleta, K.M., Newgard, C. B., Ashorn, P., Dewey, K. G., Gordon, J.I. (2016):** Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science*, 351(6275):aad3311.
- Boger, M.C.L., Lammerts van Bueren, A., Dijkhuizen, L. (2018):** Cross-Feeding among probiotic bacterial strains on prebiotic inulin involves the extracellular *exo*-inulinase of *Lactobacillus paracasei* strain W20. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(21):e01539-18.
- Bolam, D.N., Sonnenburg, J.L. (2011):** Mechanistic insight into polysaccharide use within the intestinal microbiota. *Gut Microbes*, 2(2):86–90.

- Boon, M.A., van't Riet, K., Janssen, A.E.M. (2000):** Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, 70(4):411–420.
- Bornet, F.R.J., Meflah, K., Menanteau, J. (2002):** Enhancement of gut immune functions by short-chain fructooligosaccharides and reduction of colon cancer risk. *Biosci. Microflora.*, 21(1):55–62.
- Bouhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Flourié, B., Bornet, F. Rambaud, J.-C. (1999):** Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J. Nutr.*, 129(1):113–116.
- Boutron-Ruault, M.-C., Marteau, P., Lavergne-Slove, A., Myara, A., Gerhardt, M.-F., Franchisseur, C., Bornet, F. (2005):** Effects of a 3-mo consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on parameters of colorectal carcinogenesis in patients with or without small or large colorectal adenomas. *Nutr. Cancer*, 53(2):160–168.
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1–2):248–254.
- Briet, F., Achour, L., Flourié, B., Beaugerie, L., Pellier, P., Franchisseur, C., Bornet, F., Rambaud, J.-C. (1995):** Symptomatic response to varying levels of fructo-oligosaccharides consumed occasionally or regularly. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 49(7): 501–507.
- Brugaletta, G., De Cesare, A., Zampiga, M., Laghi, L., Oliveri, C., Zhu, C., Manfreda, G., Syed, B., Valenzuela, L., Sirri, F. (2020):** Effects of alternative administration programs of a synbiotic supplement on broiler performance, foot pad dermatitis, caecal microbiota, and blood metabolites. *Animals*, 10(3): 522.
- Bunout, D., Barrera, G., Hirsch, S., Gattas, V., de la Maza, M., Haschke, F., Steenhout, P., Klassen, P., Hager, C., Avendano, M., Petermann, M., Munoz, C. (2004):** Effects of a nutritional supplement on the immune response and cytokine production in free-living Chilean elderly. *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 28(5): 348–354.
- Campos, D., Mescua, L., Aguilar-Galvez, A., Chirinos, R., Pedreschi, R. (2017):** Effect of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fructooligosaccharide purification technique using activated charcoal or ion exchange fixed bed column on recovery, purity and sugar content. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 52(12): 2637–2646.
- Cassani, L., Quintana, G., Moreira, M.R., Gómez-Zavaglia, A. (2018):** Relationship between carbohydrate composition and fungal deterioration of functional strawberry juices preserved using non-thermal treatments. *J. Sci. Food Agric.*, 98(9): 3271–3279.
- Charoenwongpaiboon, T., Punnatin, P., Klaewkla, M., Ayutthaya, P.P.N., Wangpaiboon, K., Chunsrivirod, S., Field, R.A. Pichyangkura, R. (2020):** Conserved calcium-binding residues at



- the Ca-I site involved in fructooligosaccharide synthesis by *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase. *ACS omega*, 5(43): 28001-28011.
- Charoenwongpaiboon, T., Sitthiyotha, T., Ayutthaya, P.P.N., Wangpaiboon, K., Chunsrivirod, S., Prousoontorn, M.H., Pichyangkura, R. (2019):** Modulation of fructooligosaccharide chain length and insight into the product binding motif of *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase. *Carbohydr. Polym.*, 209: 111–121.
- Charoenwongpaiboon, T., Wangpaiboon, K., Pichyangkura, R., Prousoontorn, M.H. (2018):** Highly porous core–shell chitosan beads with superb immobilization efficiency for *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase and production of inulin-type fructooligosaccharides. *RSC Adv.*, 8(30): 17008–17016.
- Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P.A., Bernalier-Donadille, A. (2008):** *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58(4): 1008–1013.
- Chaudhary, A., Gupta, L.K., Gupta, J.K., Banerjee, U.C. (1996):** Purification and properties of levanase from *Rhodotorula* sp. *J. Biotechnol.*, 46(1): 55–61.
- Chen, C., Zhao, G., Chen, W., Guo, B. (2015):** Metabolism of fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST-III via differential gene transcription and alteration of cell membrane fluidity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(22): 7697–7707.
- Chen, D., Yang, X., Yang, J., Lai, G., Yong, T., Tang, X., Shuai, O., Zhou, G., Xie, Y., Wu, Q. (2017a):** Prebiotic effect of fructooligosaccharides from *Morinda officinalis* on Alzheimer’s disease in rodent models by targeting the microbiota-gut-brain axis. *Front. Aging Neurosci.*, 9:403.
- Chen, G., Li, C., Chen, K. (2016a):** Chapter 6 - Fructooligosaccharides: a review on their mechanisms of action and effects. In: Atta-ur-Rahman (ed.) *Studies in natural products chemistry*. Elsevier, pp. 209–229.
- Chen, J., Wright, K., Davis, J.M., Jeraldo, P., Marietta, E.V., Murray, J. Nelson, H., Matteson, E.L., Taneja, V. (2016b):** An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.*, 8(1): 43.
- Chen, K., Chen, H., Faas, M.M., de Haan, B.J., Li, J., Xiao, P., Zhang, H., Diana, J., de Vos, P., Sun, J. (2017b):** Specific inulin-type fructan fibers protect against autoimmune diabetes by modulating gut immunity, barrier function, and microbiota homeostasis. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61(8): 1601006.
- Chen, X., de Vos, P. (2023):** Structure-function relationship and impact on the gut-immune barrier function of non-digestible carbohydrates and human milk oligosaccharides applicable for infant formula. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1–21.
- Cherbut, C., Michel, C., Lecannu, G. (2003):** The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides

are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J. Nutr.*, 133(1): 21–27.

- Chi, L., Khan, I., Lin, Z., Zhang, J., Lee, M.Y.S., Leong, W., Hsiao, W.L.W., Zheng, Y. (2020):** Fructooligosaccharides from *Morinda officinalis* remodeled gut microbiota and alleviated depression features in a stress rat model. *Phytomedicine*, 67: 153157.
- Chng, K.R., Ghosh, T.S., Tan, Y.H., Nandi, T., Lee, I.R., Ng, A.H.Q., Li, C., Ravikrishnan, A., Lim, K.M., Lye, D., Barkham, T., Raman, K., Chen, S.L., Chai, L., Young, B., Gan, Y.-H., Nagarajan, N. (2020):** Metagenome-wide association analysis identifies microbial determinants of post-antibiotic ecological recovery in the gut. *Nat. Ecol. Evol.*, 4(9): 1256–1267.
- Choukade, R., Kango, N. (2021):** Production, properties, and applications of fructosyltransferase: a current appraisal. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 41(8): 1178–1193.
- Claesson, M.J., O’Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., O’Toole, P.W. (2009):** Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE*, 4(8): e6669.
- Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R., Casal, M. (2013):** Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation. *Microb. Cell Factories*, 12(1): 21.
- Colnet, B., Sieber, C.M.K., Perraudeau, F., Leclerc, M. (2021):** FiberGrowth Pipeline: a framework toward predicting fiber-specific growth from human gut Bacteroidetes genomes. *Front. Microbiol.*, 12: 632567.
- Companys, J., Gosalbes, M.J., Pla-Pagà, L., Calderón-Pérez, L., Llauradó, E., Pedret, A., Valls, R.M., Jiménez-Hernández, N., Sandoval-Ramirez, B.A., del Bas, J.M., Caimari, A., Rubió, L., Solà, R. (2021):** Gut microbiota profile and its association with clinical variables and dietary intake in overweight/obese and lean subjects: a cross-sectional study. *Nutrients*, 13(6): 2032.
- Correia, D.M., Dias, L.G., Veloso, A.C.A., Dias, T., Rocha, I., Rodrigues, L.R., Peres, A.M. (2014):** Dietary sugars analysis: quantification of fructooligosaccharides during fermentation by HPLC-RI method. *Front. Nutr.*, 1:11.
- Costabile, A., Kolida, S., Klinder, A., Gietl, E., Bäuerlein, M., Froberg, C., Landschütze, V., Gibson, G.R. (2010):** A double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (*Cynara scolymus*) in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.*, 104(7): 1007–1017.
- Crittenden, R., Playne, M. (2002):** Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58(3): 297–302.
- Crost, E.H., Tailford, L.E., Le Gall, G., Fons, M., Henrissat, B., Juge, N. (2013):** Utilisation of mucin

- glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent. *PLoS ONE*, 8(10): e76341.
- Crost, E.H., Coletto, E., Bell, A., Juge, N. (2023):** *Ruminococcus gnavus*: friend or foe for human health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 47(2): fuad014.
- Cruz, R., Cruz, V.D., Belini, M.Z., Belote, J.G., Vieira, C.R. (1998):** Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. *Bioresour. Technol.*, 65(1): 139–143.
- Cryan, J.F., O’Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K.V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., Codagnone, M.G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A.V., Guzzetta, K.E., Jaggar, M. Long-Smith, C.M., Lyte, J.M., Martin, J.A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., O’Connor, R. et al. (2019):** The microbiota-gut-brain axis. *Physiol. Rev.*, 99(4): 1877–2013.
- Cuevas-Juárez, E., Ávila-Fernández, Á., López-Munguía, A. (2017):** Identification of enzymatic activities involved in agave fructan consumption by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *J. Funct. Foods.*, 35: 267–278.
- Cui, Y., Zhang, L., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Lü, X. (2022):** Roles of intestinal *Parabacteroides* in human health and diseases. *FEMS Microbiol. Lett.*, 369(1): fnac072.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T. (1987):** Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10): 1221–1227.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J. (2014):** Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484): 559–563.
- De Angelis, M., Montemurno, E., Vannini, L., Cosola, C., Cavallo, N., Gozzi, G., Maranzano, V., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Gesualdo, L. (2015):** Effect of whole-grain barley on the human fecal microbiota and metabolome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(22): 7945–7956.
- de Cassia Freitas, K., Amancio, O.M.S., de Morais, M.B. (2012):** High-performance inulin and oligofructose prebiotics increase the intestinal absorption of iron in rats with iron deficiency anaemia during the growth phase. *Br. J. Nutr.*, 108(6): 1008–1016.
- De Filippis, F., Pasolli, E., Tett, A., Tarallo, S., Naccarati, A., De Angelis, M., Neviani, E., Cocolin, L., Gobbetti, M., Segata, N., Ercolini, D. (2019):** Distinct genetic and functional traits of human intestinal *Prevotella copri* strains are associated with different habitual diets. *Cell Host Microbe*, 25(3): 444-453.e3.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S.,**

- Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010):** Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(33): 14691–14696.
- de Lima, M.Z.T., de Almeida, L.R., Mera, A.M., Bernardes, A., Garcia, W., Muniz, J.R.C. (2021):** Crystal structure of a sucrose-6-phosphate hydrolase from *Lactobacillus gasseri* with potential applications in fructan production and the food Industry. *J. Agric. Food Chem.* 69(35): 10223-10234.
- 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 Metab.*, 24(1): 151–157.
- Delgado, G.T.C., Thomé, R., Gabriel, D.L., Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M. (2012):** Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. *Nutr. Res.*, 32(11): 884–892.
- Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, n., Muller, A., Young, V.B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T.S., Núñez, G., Martens, E.C. (2016):** A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, 167(5): 1339-1353.e21.
- Dewulf, E.M., Cani, P.D., Claus, S.P., Fuentes, S., Puylaert, P.G., Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Thiessen, J.-P., Delzenne, N.M. (2013):** Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*, 62(8): 1112–1121.
- Dey, M. (2017):** Toward a personalized approach in prebiotics research. *Nutrients*, 9(2): 92.
- Di Bartolomeo, F., Startek, J.B., Van den Ende, W. (2013):** Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? *Phytother. Res.*, 27(10): 1457–1473.
- Díez-Municio, M., González-Santana, C., de las Rivas, B., Jimeno, M.L., Muñoz, R., Moreno, F.J., Herrero, M. (2015):** Synthesis of potentially-bioactive lactosyl-oligofructosides by a novel bi-enzymatic system using bacterial fructansucrases. *Food Res. Int.*, 78:258–2565.
- Díez-Municio, M., Herrero, M., de las Rivas, B., Muñoz, R., Jimeno, M.L., Moreno, F.J. (2016):** Synthesis and structural characterization of raffinoyl-oligofructosides upon transfructosylation by *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 inulosucrase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(14): 6251–6263.
- Díez-Municio, M., de las Rivas, B., Jimeno, M.L., Muñoz, R., Moreno, F.J., Herrero, M. (2013):** Enzymatic synthesis and characterization of fructooligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(13): 4129–4140.

- Dogra, S., Sakwinska, O., Soh, S.-E., Ngom-Bru, C., Brück, W.M., Berger, B., Brüssow, H., Lee, Y.S., Yap, F., Chong, Y.-S., Godfrey, K.M., Holbrook, J.D. (2015):** Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio*. 6(1): e02419-14.
- Dominguez, A.L., Rodrigues, L.R., Lima, N.M., Teixeira, J.A. (2014):** An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food Bioprocess Technol.*, 7(2): 324–337.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K. (2016):** Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14(1): 20–32.
- Dridi, L., Altamura, F., Gonzalez, E., Lui, O., Kubinski, R., Pidgeon, R., Montagut, A., Chong, J., Xia, J., Maurice, C.F., Castagner, B (2023):** Identifying glycan consumers in human gut microbiota samples using metabolic labeling coupled with fluorescence-activated cell sorting. *Nat. Commun.*, 14(1): 662.
- Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., Terrapon, N. (2022):** The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res.*, 50(D1): D571–577.
- Duncan, S.H., Hold, G.L., Harmsen, H.J.M., Stewart, C.S., Flint, H.J. (2002):** Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52(6): 2141–2146.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. (2005):** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728): 1635–1638.
- Eggerth, A.H., Gagnon, B.H. (1933):** The Bacteroides of human feces. *J. Bacteriol.*, 25(4): 389–413.
- El-Salhy, M. (2023):** Intestinal bacteria associated with irritable bowel syndrome and chronic fatigue. *Neurogastroenterol. Motil.* 35: e14621.
- Ernits, K., Eek, P., Lukk, T., Visnapuu, T., Alamäe, T. (2019):** First crystal structure of an endo-levanase - the BT1760 from a human gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Sci. Rep.*, 9(1): 8443.
- Falony, G., Calmeyn, T., Leroy, F., De Vuyst, L. (2009):** Coculture Fermentations of *Bifidobacterium* species and *Bacteroides thetaiotaomicron* reveal a mechanistic insight into the prebiotic effect of inulin-type fructans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(8): 2312–2319.
- Fan, S., Zhang, Z., Zhao, Y., Daglia, M., Zhang, J., Zhu, Y., Bail, J., Zhu, L., Xiao, X. (2023):** Recent advances in targeted manipulation of the gut microbiome by prebiotics: from taxonomic composition to metabolic function. *Curr. Opin. Food Sci.*, 49: 100959.

- Fan, Y., Pedersen, O. (2021): Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 19(1): 55–71.
- Fehlner-Peach, H., Magnabosco, C., Raghavan, V., Scher, J.U., Tett, A., Cox, L.M., Gottsegen, C., Watters, A., Wiltshire-Gordon, J.D., Segata, N., Bonneau, R., Littman D.R. (2019): Distinct polysaccharide utilization profiles of human intestinal *Prevotella copri* isolates. *Cell Host Microbe*, 26(5): 680-690.e5.
- Fernández-Lainez, C., de Stegge, M.A., Silva-Lagos, L.A., López-Velázquez, G., de Vos, P. (2023):  $\beta(2 \rightarrow 1)$ - $\beta(2 \rightarrow 6)$  branched graminan-type fructans and  $\beta(2 \rightarrow 1)$  linear fructans impact mucus-related and endoplasmic reticulum stress-related genes in goblet cells and attenuate inflammatory responses in a fructan dependent fashion. *Food Funct.*, 14(3): 1338-1348.
- Fernández-Lainez, C., Akkerman, R., Oerlemans, M.M.P., Logtenberg, M.J., Schols, H.A., Silva-Lagos, L.A., López-Velázquez, G., de Vos, P. (2022):  $\beta(2 \rightarrow 6)$ -Type fructans attenuate proinflammatory responses in a structure dependent fashion via Toll-like receptors. *Carbohydr. Polym.*, 277: 118893.
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., Roberfroid, M. (2001): Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 41(5): 353–362.
- Flores, A.C., Morlett, J.A., Rodríguez, R. (2016): Inulin potential for enzymatic obtaining of prebiotic oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56(11): 1893–1902.
- Forouhi, N.G., Krauss, R.M., Taubes, G., Willett, W. (2018): Dietary fat and cardiometabolic health: evidence, controversies, and consensus for guidance. *BMJ.*, 361: k2139.
- Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. (2007): Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(34): 13780–13785.
- Fransen, F., Sahasrabudhe, N.M., Elderman, M., Bosveld, M., El Aidy, S., Hugenholtz, F., Borghuis, T., Kousemaker, B., Winkel, S., van der Gaast-de Jongh, C., de Jonge, M.I., Boekschoten, M.V., Smidt, H. Schols, H.A., de Vos, P. (2017):  $\beta 2 \rightarrow 1$ -Fructans modulate the immune system *in vivo* in a microbiota-dependent and -independent fashion. *Front. Immunol.*, 8: 154.
- Frick, J.S., Fink, K., Kahl, F., Niemiec, M.J., Quitadamo, M., Schenk, K., Autenrieth, I.B. (2007): Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infect. Immun.*, 75(7): 3490–3497.
- Frolova, M.S., Suvorova, I.A., Iablokov, S.N., Petrov, S.N., Rodionov, D.A. (2022): Genomic reconstruction of short-chain fatty acid production by the human gut microbiota. *Front.*

*Mol. Biosci.*, 9: 949563.

- Frost, G., Sleeth, M.L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J.R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E.L., Bell, J.D. (2014):** The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat. Commun.*, 5: 3611.
- Fu, J., Zheng, Y., Gao, Y., Xu, W. (2022):** Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health. *Microorganisms*, 10(12): 2507.
- Fukasawa, T., Murashima, K., Matsumoto, I., Hosono, A., Ohara, H., Nojiri, C., Koga, J., Kubota, H., Kanegae, M., Kaminogawa, S., Abe, K., Kono, T. (2007):** Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55(8): 3174–3179.
- 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. *Front. Microbiol.*, 10: 2083.
- Garcia-Peris, P., Velasco, C., Hernandez, M., Lozano, M.A., Paron, L., de la Cuerda, C., Breton, I., Camblor, M., Guarner, F. (2016):** Effect of inulin and fructo-oligosaccharide on the prevention of acute radiation enteritis in patients with gynecological cancer and impact on quality-of-life: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 70(2): 170–174.
- Geiger, B., Nguyen, H.-M., Wenig, S., Nguyen, H.A., Lorenz, C., Kittl, R., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H., Haltrich, D., Ngueyen, T.-H. (2016):** From by-product to valuable components: efficient enzymatic conversion of lactose in whey using  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochem. Eng. J.*, 116: 45–53.
- Ghuri, K., Ali, H., Munawar, N., Ghauri, M.A., Anwar, M.A. (2020):** Glycoside hydrolase family 68 gene of halophilic archaeon *Halalkalicoccus jeotgali* B3T codes for an inulosucrase enzyme. *Biocatal. Biotransformation.*, 39(3): 206-213.
- Ghuri, K., Pijning, T., Munawar, N., Ali, H., Ghauri, M. A., Anwar, M. A., Wallis, R. (2021):** Crystal structure of an inulosucrase from *Halalkalicoccus jeotgali* B3T, a halophilic archaeal strain. *FEBS J.*, 288(19): 5723-5736.
- Gibbons, S.M., Gurry, T., Lampe, J.W., Chakrabarti, A., Dam, V., Everard, A., Goas, A., Gross, G., Kleerebezem, M., Lane, J., Maukonen, J., Penna, A.L.B., Pot, B., Valdes, A.M., Walton, G., Weiss, A., Zanzer, Y.C., Venlet, N.V., Miani, M. (2022):** Perspective: leveraging the gut microbiota to predict personalized responses to dietary, prebiotic, and probiotic interventions. *Adv. Nutr.*, 13(5): 1450–1461.
- Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X., Cummings, J.H. (1995):** Selective stimulation of

- bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108(4): 975–982.
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. (2017):** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 14(8): 491.
- Gibson, P.R., Shepherd, S.J. (2005):** Personal view: food for thought – western lifestyle and susceptibility to Crohn’s disease. The FODMAP hypothesis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 21(12): 1399–1409.
- Gibson, P.R., Shepherd, S.J. (2010):** Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 25(2): 252–258.
- Glenwright, A.J., Pothula, K.R., Bhamidimarri, S.P., Chorev, D.S., Baslé, A., Firbank, S.J., Zheng, H., Robinson, C.V., Winterhalter, M., Kleinekathöfer, U., Bolam, D.N., van den Berg, B. (2017):** Structural basis for nutrient acquisition by dominant members of the human gut microbiota. *Nature*, 541(7637): 407–411.
- Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R. (2015):** Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 6(1): 137–156.
- Gomaa, E.Z. (2020):** Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(12): 2019–2040.
- Gomez-Arango, L.F., Barrett, H.L., Wilkinson, S.A., Callaway, L.K., McIntyre, H.D., Morrison, M., Dekker Nitert, M. (2018):** Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes.*, 9(3): 189–201.
- Gómez-García, R., Sánchez-Gutiérrez, M., Freitas-Costa, C., Vilas-Boas, A.A., Campos, D.A., Aguilar, C.N., Madureira, A.R., Pintado, M. (2022):** Prebiotic effect, bioactive compounds and antioxidant capacity of melon peel (*Cucumis melo* L. *inodorus*) flour subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and human faecal fermentation. *Food Res. Int.*, 154: 111045.
- Grenda, T., Grenda, A., Domaradzki, P., Krawczyk, P., Kwiatek, K. (2022):** Probiotic potential of *Clostridium* spp.—advantages and doubts. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 44(7): 3118–3130.
- Grondin, J.M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D.W., Brumer, H. (2017):** Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *J. Bacteriol.*, 199(15): 10.1128/jb.00860-16.
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., He, P. (2020):** *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 11(1): 24.
- Guo, Z., Zhang, J., Wang, Z., Ang, K.Y., Huang, S., Hou, Q., Su, X., Qiao, J., Zheng, Y., Wang, L.,**



- Koh, E., Danliang, H., Xu, J., Lee, Y.K., Zhang, H. (2016):** Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans. *Sci. Rep.*, 6(1): 20602.
- Hahnke, R.L., Meier-Kolthoff, J.P., García-López, M., Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N.N., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., Göker, M. (2016):** Genome-based taxonomic classification of Bacteroidetes. *Front. Microbiol.*, 7: 2003.
- Hansen, M.E.B., Rubel, M.A., Bailey, A.G., Ranciaro, A., Thompson, S.R., Campbell, M.C., et al. (2019):** Population structure of human gut bacteria in a diverse cohort from rural Tanzania and Botswana. *Genome Biol.*, 20(1): 16.
- Hao, Q., Nan, T., Zhou, L., Kang, L., Guo, L., Yu, Y. (2019):** Rapid simultaneous quantification of fructooligosaccharides in *Morinda officinalis* by ultra-high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 42(13): 2222–2230.
- Harvie, R., Walmsley, R., Schultz, M., New Zealand Society of Gastroenterology (2017):** “We are what our bacteria eat”: The role of bacteria in personalizing nutrition therapy in gastrointestinal conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 32(2): 352–357.
- Hayashi, H., Shibata, K., Sakamoto, M., Tomita, S., Benno, Y. (2007):** *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57(5): 941–946.
- Hayashi, S., Yoshiyama, T., Fujii, N., Shinohara, S. (2000):** Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol. Lett.*, 22(18): 1465–1459.
- He, C., Yang, Y., Zhao, R., Qu, J., Jin, L., Lu, L., Xu, L., Xiao, M. (2018):** Rational designed mutagenesis of levansucrase from *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 for product specificity study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(7): 3217–3228.
- Healey, G., Murphy, R., Butts, C., Brough, L., Whelan, K., Coad, J. (2018):** Habitual dietary fibre intake influences gut microbiota response to an inulin-type fructan prebiotic: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over, human intervention study. *Br. J. Nutr.*, 119(2): 176–189.
- Hendry, G.A.F. (1993):** Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.*, 123(1): 3–14.
- Henke, M.T., Kenny, D.J., Cassilly, C.D., Vlamakis, H., Xavier, R.J., Clardy, J. (2019):** *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn’s disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 116(26): 12672–12677.
- Hernández, L., Plou, F.J. (2023):** Chapter 1 - Fructans: the terminology. In: Van den Ende, W., Öner E.T. (ed.) the book of fructans. *Academic Press*, pp. 3–10.
- Heyer, A.G., Schroer, B., Radosta, S., Wolff, D., Czapla, S., Springer, J. (1998):** Structure of the

- enzymatically synthesized fructan inulin. *Carbohydr. Res.*, 313(3): 165–174.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., Tashiro, Y. (1986):** Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobact. Microflora.*, 5(1): 37–50.
- Hidaka, H., Hirayama, M., Sumi, N. (1988):** A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, 52(5): 1181–1187.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014):** The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11(8): 506–514.
- Hitch, T.C.A., Bisdorf, K., Afrizal, A., Riedel, T., Overmann, J., Strowig, T., Clavel, T. (2022):** A taxonomic note on the genus *Prevotella*: description of four novel genera and emended description of the genera *Hallella* and *Xylanibacter*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 45(6): 126354.
- Hold, G.L., Pryde, S.E., Russell, V.J., Furrie, E., Flint, H.J. (2002):** Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 239(1): 33–39.
- Holdeman, L.V., Moore, W.E.C. (1974):** New genus, *Coprococcus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 24(2): 260–277.
- Holmes, Z.C., Villa, M.M., Durand, H.K., Jiang, S., Dallow, E.P., Petrone, B.L., Silverman, J.D., Lin, P.-h., David, L.A. (2022):** Microbiota responses to different prebiotics are conserved within individuals and associated with habitual fiber intake. *Microbiome*, 10(1): 114.
- Holscher, H.D., Bauer, L.L., Gourineni, V., Pelkman, C.L., Fahey, G.C.Jr., Swanson, K.S. (2015):** Agave inulin supplementation affects the fecal microbiota of healthy adults participating in a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J. Nutr.*, 145(9): 2025–2032.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007):** Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.*, 407(2): 189–198.
- Hövels, M. (2020):** Optimierung der mikrobiellen Produktion von präbiotischen Zuckerderivaten auf Levan-Basis. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T., Creasy, H.H., Earls, A.M., FitzGerald, M.G., Fulton, R.S., Giglio, M.G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E.A., Madupu, R., Magrini, V. Martin, J.C., Mitreva, M., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Versalovic, J. et al. (2012):** Structure, function and diversity of the healthy human

- microbiome. *Nature*, 486(7402): 207–214.
- Igarashi, T., Takahashi, M., Yamamoto, A., Etoh, Y., Takamori, K. (1987):** Purification and characterization of levanase from *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. *Infect. Immun.*, 55(12): 3001–3005.
- Ihling, N., Bittner, N., Diederichs, S., Schelden, M., Korona, A., Höfler, G.T., Fulton, A., Jaeger, K.-E., Honda, K., Ohtake, H., Büchs, J. (2018):** Online measurement of the respiratory activity in shake flasks enables the identification of cultivation phases and patterns indicating recombinant protein production in various *Escherichia coli* host strains. *Biotechnol. Prog.*, 34(2): 315–327.
- Illiano, P., Brambilla, R., Parolini, C. (2020):** The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *FEBS J.*, 287(5): 833–855.
- Islam, S.M.S., Ryu, H.-M., Sayeed, H.M., Byun, H.-O., Jung, J.-Y., Kim, H.-A., Suh, C.-H., Sohn, S. (2021):** *Eubacterium rectale* attenuates HSV-1 induced systemic inflammation in mice by inhibiting CD83. *Front. Immunol.*, 12: 712312.
- Ispiryan, L., Zannini, E., Arendt, E.K. (2022):** FODMAP modulation as a dietary therapy for IBS: scientific and market perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21(2): 1491–1516.
- Jensen, S.L., Diemer, M.B., Lundmark, M., Larsen, F.H., Blennow, A., Mogensen, H.K., Nielsen, T.H. (2016):** Levanase from *Bacillus subtilis* hydrolyses  $\beta$ -2,6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 85: 514–521.
- Jethwani, P., Grover, K. (2019):** Gut microbiota in health and diseases – a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 8(8): 1586–1599.
- Jiang, B., Yuan, G., Wu, J., Wu, Q., Li, L., Jiang, P. (2022):** *Prevotella copri* ameliorates cholestasis and liver fibrosis in primary sclerosing cholangitis by enhancing the FXR signalling pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.*, 1868(3): 166320.
- Joglekar, P., Sonnenburg, E.D., Higginbottom, S.K., Earle, K.A., Morland, C., Shapiro-Ward, S., Bolam, D.N., Sonnenburg, J.L. (2018):** Genetic variation of the SusC/SusD homologs from a polysaccharide utilization locus underlies divergent fructan specificities and functional adaptation in *Bacteroides thetaiotaomicron* strains. *mSphere*, 3(3): e00185-18.
- Joossens, M., Preter, V.D., Ballet, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vermeire, S. (2012):** Effect of oligofructose-enriched inulin (OF-IN) on bacterial composition and disease activity of patients with Crohn’s disease: results from a double-blinded randomised controlled trial. *Gut*, 61(6): 958–958.
- Kageyama, A., Benno, Y. (2000):** Emendation of genus *Collinsella* and proposal of *Collinsella stercoris* sp. nov. and *Collinsella intestinalis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50(5): 1767–1774.

- Kang, S., You, H.J., Lee, Y.-G., Jeong, Y., Johnston, T.V., Baek, N.-I., Ku, S., Ji, G.E. (2020):** Production, structural characterization, and *in vitro* assessment of the prebiotic potential of butyl-fructooligosaccharides. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(2): 445.
- Kang, S.K., Lee, S.O., Lim, Y.S., Jang, K.L., Lee, T.H. (1998):** Purification and characterization of a novel levanooctase-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 27(2): 159–166.
- Kasperowicz, A., Pristaš, P., Píknová, M., Javorský, P., Guczyńska, W., Michałowski, T., Kwiatkowska, E. (2010):** Fructanolytic and saccharolytic enzymes of *Treponema zioleckii* strain kT. *Anaerobe*, 16(4): 387–392.
- Kastl, A.J., Terry, N.A., Wu, G.D., Albenberg, L.G. (2020):** The structure and function of the human small intestinal microbiota: current understanding and future directions. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 9(1): 33–45.
- Kiewiet, M.B.G., Elderman, M.E., El Aidy, S., Burgerhof, J.G.M., Visser, H., Vaughan, E.E., Faas, M.M., de Vos, P. (2021):** Flexibility of gut microbiota in ageing individuals during dietary fiber long-chain inulin intake. *Mol. Nutr. Food Res.*, 65(4): 2000390.
- Kim, B.W., Choi, J.W., Yun, J.W. (1998):** Selective production of GF4-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. *Biotechnol. Lett.*, 20(11): 1031–1034.
- Kim, K., Choe, D., Lee, D.-H., Cho, B.-K. (2020):** Engineering biology to construct microbial chassis for the production of difficult-to-express proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(3): 990.
- King, C.H., Desai, H., Sylvetsky, A.C., LoTempio, J., Ayanyan, S., Carrie, J., Crandall, K.A., Fochtman, B.C., Gasparyan, L., Gulzar, N., Howell, P., Issa, N., Krampis, K., Mishra, L., Morizono, H., Pisegna, J.R., Rao, S., Ren, Y., Simonyan, V., Smith, K. et al. (2019):** Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLoS ONE*, 14(9): e0206484.
- Kirtel, O., Lescrier, E., Van den Ende, W., Öner, E.T. (2019):** Discovery of fructans in Archaea. *Carbohydr. Polym.*, 220: 149–156.
- Ko, H., Bae, J.-H., Sung, B.H., Kim, M.-J., Park, H.-J., Sohn, J.-H. (2019):** Microbial production of medium chain fructooligosaccharides by recombinant yeast secreting bacterial inulosucrase. *Enzyme Microb. Technol.*, 130: 109364.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F. (2016):** From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6): 1332–1345.
- Kolodziejczyk, A.A., Zheng, D., Elinav, E. (2019):** Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat. Rev. Microbiol.*, 17(12): 742–753.
- Kovács, Z., Benjamins, E., Grau, K., Ur Rehman, A., Ebrahimi, M., Czermak, P. (2014):** Recent developments in manufacturing oligosaccharides with prebiotic functions. In: Zorn, H.,

- Czermak, P. (eds.) Biotechnology of food and feed additives. *Springer*, pp. 257–95.
- Kovatcheva-Datchary, P. (2022):** The enigma of *Prevotella copri*. In: de Bruijn, F.J., Smidt, H., Cocolin, L.S., Sauer, M., Dowling, D., Thomashow, L. (eds.) good microbes in medicine, food production, biotechnology, bioremediation, and agriculture. *John Wiley & Sons*, pp. 64–8.
- Kraal, L., Abubucker, S., Kota, K., Fischbach, M.A., Mitreva, M. (2014):** The prevalence of species and strains in the human microbiome: a resource for experimental efforts. *PLoS ONE.*, 9(5): e97279.
- Kralj, S., Leeflang, C., Sierra, E.I., Kempniński, B., Alkan, V., Kolkman, M. (2018):** Synthesis of fructooligosaccharides (FosA) and inulin (InuO) by GH68 fructosyltransferases from *Bacillus agaradhaerens* strain WDG185. *Carbohydr. Polym.*, 179: 350–359.
- Krumbeck, J., Maldonado-Gomez, M., Ramer-Tait, A., Hutkins, R. (2016):** Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. *Fac. Publ. Food Sci. Technol.*, 32(2): 110-119.
- Kruschitz, A., Nidetzky, B. (2020):** Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 43: 107568.
- Kuhn, R.C., Filho, F.M. (2010):** Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. *New Biotechnol.*, 27(6): 862–869.
- Kuhn, R.C., Maugeri Filho, F., Silva, V., Palacio, L., Hernández, A., Prádanos, P. (2010):** Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. *J. Membr. Sci.*, 365(1): 356–365.
- Kuhn, R.C., Mazutti, M.A., Albertini, L.B., Filho, F.M. (2014):** Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. *New Biotechnol.*, 31(3): 237–241.
- Kumar, C.G., Sripada, S., Poornachandra, Y. (2018):** Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals. In: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (eds.) Role of materials science in food bioengineering. *Academic Press*, pp. 451–503.
- Kwon, Y.-M., Kim, H.-Y., Choi, Y.-J. (2000):** Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10(2): 238–243.
- Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–685.
- Lahti, L., Salonen, A., Kekkonen, R.A., Salojärvi, J., Jalanka-Tuovinen, J., Palva, A., Orešič, M., de Vos, W.M. (2013):** Associations between the human intestinal microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. *PeerJ*, 1: e32.
- Lam, K.-L., Cheung, P.C.-K. (2019):** Carbohydrate-based prebiotics in targeted modulation of gut

- microbiome. *J. Agric. Food Chem.*, 67(45): 12335–12340.
- Lambeth, S.M., Carson, T., Lowe, J., Ramaraj, T., Leff, J.W., Luo, L., et al. (2015):** Composition, diversity and abundance of gut microbiome in prediabetes and type 2 diabetes. *J. Diabetes Obes.*, 2(3): 1–7.
- Lateef, A., Oloke, J.K., Prapulla, S.G. (2007):** The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Enzyme Microb. Technol.*, 40(5): 1067–1070.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottière, H.M., Cherbut, C. (1999):** Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J. Nutr.*, 129(12): 2231–2235.
- Li, B., Zhang, H., Shi, L., Li, R., Luo, Y., Deng, Y., Li, S., Li, R., Liu, Z. (2022):** *Saccharomyces boulardii* alleviates DSS-induced intestinal barrier dysfunction and inflammation in humanized mice. *Food Funct.*, 13(1): 102–112.
- Li, J., Gálvez, E.J.C., Amend, L., Almási, É., Iljazovic, A., Lesker, T.R., Bielecka, A.A., Schorr, E.-M., Strowig, T. (2021a):** A versatile genetic toolbox for *Prevotella copri* enables studying polysaccharide utilization systems. *EMBO J.*, 40(23): e108287.
- Li, Y., Hintze, K.J., Ward, R.E. (2021b):** Effect of supplemental prebiotics, probiotics and bioactive proteins on the microbiome composition and fecal calprotectin in C57BL6/j mice. *Biochimie.*, 185: 43–52.
- Lian, D., Zhuang, S., Shui, C., Zheng, S., Ma, Y., Sun, Z., Porrás-Domínguez, J.R., Öner, E.T., Liang, M., Van den Ende, W. (2022):** Characterization of inulolytic enzymes from the Jerusalem artichoke-derived *Glutamicibacter mishrai* NJAU-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 106(17): 5525–5538.
- Lindsay, J.O., Whelan, K., Stagg, A.J., Gobin, P., Al-Hassi, H.O., Rayment, N., Kamm, M.A., Knight, S.C., Forbes, A. (2006):** Clinical, microbiological, and immunological effects of fructooligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*, 55(3): 348–355.
- Linke, C.M., Woodiga, S.A., Meyers, D.J., Buckwalter, C.M., Salhi, H.E., King, S.J. (2013):** The ABC transporter encoded at the pneumococcal fructooligosaccharide utilization locus determines the ability to utilize long- and short-chain fructooligosaccharides. *J. Bacteriol.*, 195(5): 1031–1041.
- Liu, C., Kolida, S., Charalampopoulos, D., Rastall, R.A. (2020):** An evaluation of the prebiotic potential of microbial levans from *Erwinia* sp. 10119. *J. Funct. Foods.*, 64: 103668.
- Liu, F., Li, P., Chen, M., Luo, Y., Prabhakar, M., Zheng, H., He, Y., Qi, Q., Long, H., Zhang, Y., Sheng, H., Zhou, H. (2017):** Fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) increase *Bifidobacterium* but reduce butyrate producing bacteria with adverse glycemic metabolism

- in healthy young population. *Sci. Rep.*, 7(1): 11789.
- Liu, Q., Mak, J.W.Y., Su, Q., Yeoh, Y.K., Lui, G.C.-Y., Ng, S.S.S., (2022):** Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. *Gut*, 71(3): 544–552.
- Liu, X., Cheng, Y.-W., Shao, L., Sun, S.-H., Wu, J., Song, Q.-H., Zou, H.-S., Ling, Z.-X. (2021):** Gut microbiota dysbiosis in Chinese children with type 1 diabetes mellitus: an observational study. *World J. Gastroenterol.*, 27(19): 2394–2414.
- Lobo, A.R., Colli, C., Filisetti, T.M.C.C. (2006):** Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutr. Res.*, 26(8): 413–420.
- Lobo, A.R., Gaievski, E.H.S., Carli, E.D., Alvares, E.P., Colli, C. (2014):** Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats: the effects on iron species distribution, ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. *Br. J. Nutr.*, 112(8): 1286–1295.
- Loo, J.V., Coussement, P., Leenheer, L.D., Hoebregs, H., Smits, G. (1995):** On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35(6): 525–552.
- Lopetuso, L.R., Scaldaferri, F., Petito, V., Gasbarrini, A. (2013):** Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.*, 5(1): 23.
- Lopez-Siles, M., Duncan, S.H., Garcia-Gil, L.J., Martinez-Medina, M. (2017):** *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.*, 11(4): 841–852.
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Surís-Valls, R., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Flint, H.J., Garcia-Gil, L.J. (2016):** Changes in the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* phylogroups I and II in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease and patients with colorectal cancer. *Inflamm. Bowel Dis.*, 22(1): 28–41.
- Losen, M., Frölich, B., Pohl, M., Büchs, J. (2004):** Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol. Prog.* 20(4): 1062–1068.
- Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J. (2014):** The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12(10): 661–672.
- Lu, D., Huang, Y., Kong, Y., Tao, T., Zhu, X. (2020):** Gut microecology: Why our microbes could be key to our health. *Biomed. Pharmacother.*, 131: 110784.
- Lu, H., Xu, X., Fu, D., Gu, Y., Fan, R., Yi, H., He, X., Wang, C., Ouyang, B., Zhao, P., Wang, L., Xu, P., Cheng, S., Wang, Z., Zou, D., Han, L., Zhao, W. (2022):** Butyrate-producing *Eubacterium rectale* suppresses lymphomagenesis by alleviating the TNF-induced TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B axis. *Cell Host Microbe.*, 30(8): 1139-1150.e7.
- Maeda, Y., Kurakawa, T., Umemoto, E., Motooka, D., Ito, Y., Gotoh, K., et al. (2016):** Dysbiosis

- contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol.*, 68(11): 2646–2661.
- Manson, J.M., Rauch, M., Gilmore, M.S. (2008):** The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. In: Huffnagle, G.B., Noverr, M.C. (eds.) GI microbiota and regulation of the immune system. *Springer*, pp. 15–28.
- Mao, B., Li, D., Zhao, J., Liu, X., Gu, Z., Chen, Y.Q., Zhang, H., Chen, W. (2015):** *In vitro* fermentation of fructooligosaccharides with human gut bacteria. *Food Funct.*, 6(3): 947–954.
- Margolis, K.G., Cryan, J.F., Mayer, E.A. (2021):** The microbiota-gut-brain axis: from motility to mood. *Gastroenterology.*, 160(5): 1486–1501.
- Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Langella, P. (2023):** Searching for the bacterial effector: the example of the multi-skilled commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Front. Microbiol.*, 9: 346.
- Martins, G.N., Ureta, M.M., Tymczyszyn, E.E., Castilho, P.C., Gomez-Zavaglia, A. (2019):** Technological aspects of the production of fructo- and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis. *Front. Nutr.*, 6: 78.
- Menéndez, C., Hernández, L., Selman, G., Mendoza, M.F., Hevia, P., Sotolongo, M., Arrieta, J.G. (2002):** Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Curr. Microbiol.*, 45(1): 5–12.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003):** Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 10(11): 935–941.
- Mensink, M.A., Frijlink, H.W., van der Voort Maarschalk, K., Hinrichs, W.L.J. (2015):** Inulin, a flexible oligosaccharide. I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydr. Polym.*, 130: 405–419.
- Meyer, T.S.M., Miguel, Â.S.M., Fernández, D.E.R., Ortiz, G.M.D. (2015):** Biotechnological production of oligosaccharides—applications in the food industry. In: Eissa, A.H.A. (ed.) Food production and industry 2nd ed. *InTech*, pp. 25–78.
- Mills, R.H., Dulai, P.S., Vázquez-Baeza, Y., Saucedo, C., Daniel, N., Gerner, R.R., Batachari L.E., Malfavon, M., Zhu, Q., Weldon, K., Humphrey, G., Carrillo-Terrazas, M., Goldasich, L.D., Bryant, M., Raffatellu, M., Quinn, R.A., Gewirtz, A.T., Chassaing, B., Chu, H., Sandborn, W.J. et al. (2022):** Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nat. Microbiol.*, 7(2): 262–276.
- Miremadi, F., Shah, N.P. (2012):** Applications of inulin and probiotics in health and nutrition. *Int. Food Res. J. Malays.*, 19(4): 1337–1350.



- Mohajeri, M.H., La Fata, G., Steinert, R.E., Weber, P. (2018):** Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutr. Rev.*, 76(7): 481–496.
- Molina-Infante, J., Serra, J., Fernandez-Bañares, F., Mearin, F. (2016):** The low-FODMAP diet for irritable bowel syndrome: lights and shadows. *Gastroenterol. Hepatol. Engl. Ed.*, 39(2): 55–65.
- Moore, W.E.C., Johnson, J.L., Holdeman, L.V. (1976):** Emendation of Bacteroidaceae and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 26(2): 238–252.
- Morais, L.H., Schreiber, H.L., Mazmanian, S.K. (2021):** The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.*, 19(4): 241–255.
- Morales, V., Sanz, M.L., Olano, A., Corzo, N. (2006):** Rapid separation on activated charcoal of high oligosaccharides in honey. *Chromatographia.*, 64(3): 1–6.
- Moreno-Arrones, O.M., Serrano-Villar, S., Perez-Brocal, V., Saceda-Corralo, D., Morales-Raya, C., Rodrigues-Barata, R., Moya, A., Jaen-Olasolo, P., Vano-Galvan, S. (2020):** Analysis of the gut microbiota in alopecia areata: identification of bacterial biomarkers. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 34(2): 400–405.
- Moro, G., Minoli, I., Mosca, M., Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B., Boehm, G. (2002):** Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 34(3): 291.
- 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.
- Moya, A., Ferrer, M. (2016):** Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. *Trends Microbiol.* 24(5): 402–413.
- Mukhopadhy, I., Segal, J.P., Carding, S.R., Hart, A.L., Hold, G.L. (2019):** The gut virome: the ‘missing link’ between gut bacteria and host immunity? *Ther. Adv. Gastroenterol.*, 12.
- Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M.E., López Munguía, A. (2009):** Kinetic behaviour and specificity of  $\beta$ -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochem.*, 44(8): 891–898.
- Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. (2009):** Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 344(6): 795–800.
- Mutanda, T., Mokoena, M.P., Olaniran, A.O., Wilhelmi, B.S., Whiteley, C.G. (2014):** Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. *J. Ind. Microbiol.*

*Biotechnol.*, 41(6): 893–906.

- Nakamura, Y., Nosaka, S., Suzuki, M., Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yajima, T., Takenouchi-Ohkubo, N., Iwase, T., Moro, I. (2004):** Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 137(1): 52–58.
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F. (2013):** Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.*, 69(1): 42–51.
- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., Mu, W. (2019):** Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnol. Adv.*, 37(2): 306–318.
- Ni, D., Zhang, S., Huang, Z., Xu, W., Zhang, W., Mu, W. (2022):** Directionally modulating the product chain length of an inulosucrase by semi-rational engineering for efficient production of 1-Kestotriose. *Enzyme Microb. Technol.* 160: 110085.
- Ni, D., Zhu, Y., Xu, W., Bai, Y., Zhang, T., Mu, W. (2018):** Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from *Lactobacillus gasserii* DSM 20604. *Int. J. Biol. Macromol.*, 109: 1209–1218.
- Ni, D., Zhu, Y., Xu, W., Pang, X., Lv, J., Mu, W. (2020):** Production and physicochemical properties of food-grade high-molecular-weight *Lactobacillus* inulin. *J. Agric. Food Chem.*, 68(21): 5854–5862.
- Nishizawa, K., Nakajima, M., Nabetani, H. (2001):** Kinetic study on transfructosylation by b-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for fructooligosaccharide production. *Food Sci. Technol. Res.*, 7(1): 39–44.
- Nobre, C., Castro, C.C., Hantson, A.-L., Teixeira, J.A., De Weireld, G., Rodrigues, L.R. (2016):** Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast. *Carbohydr. Polym.*, 136: 274–281.
- Nobre, C., Cerqueira, M.Â., Rodrigues, L.R., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. (2015a):** Chapter 19 - Production and extraction of polysaccharides and oligosaccharides and their use as new food additives. In: Pandey, A., Höfer, R., Taherzadeh, M., Nampoothiri, K.M., Larroche, C. (eds.) *Industrial biorefineries & white biotechnology*. Elsevier, pp. 653–679.
- Nobre, C., do Nascimento, A.K.C., Silva, S.P., Coelho, E., Coimbra, M.A., Cavalcanti, M.T.H., Teixeira, J.A., Porto, A.L.F. (2019):** Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by *Penicillium citreonigrum*. *Bioresour. Technol.*, 282: 464–474.
- Nobre, C., Simões, L.S., Gonçalves, D.A., Berni, P., Teixeira, J.A. (2022):** 5 - Fructooligosaccharides production and the health benefits of prebiotics. In: Rai, A.K., Singh, S.P., Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C.R. (eds.) *Current developments in biotechnology and bioengineering*.

*Elsevier*, pp. 109–138.

- Nobre, C., Suvarov, P., De Weireld, G. (2014):** Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation. *New Biotechnol.*, 31(1): 55–63.
- Nobre, C., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2012):** Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. *New Biotechnol.*, 29(3): 395–401.
- Nobre, C., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2015b):** New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructo-oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 55(10): 1444–1455.
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J.P., Woyke, T., Kyripides, N.C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., Göker, M. (2018):** Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.*, 9: 2007.
- Obregon-Tito, A.J., Tito, R.Y., Metcalf, J., Sankaranarayanan, K., Clemente, J.C., Ursell, L.K., Zech, X.Z., Van Treuren, W., Knight, R., Gaffney, P.M., Spicer, P., Lawson, P., Marin-Villarreal, O., Foster, M., Gujja-Poma, E., Troncoso-Corzo, L., Warinner, C., Ozga, A.T., Lewis, C.M. (2015):** Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat. Commun.*, 6(1): 6505.
- O'Donnell, M.M., Forde, B.M., Neville, B., Ross, P.R., O'Toole, P.W. (2011):** Carbohydrate catabolic flexibility in the mammalian intestinal commensal *Lactobacillus ruminis* revealed by fermentation studies aligned to genome annotations. *Microb. Cell Factories.*, 10(1): S12.
- Olivares-Illana, V., Wacher-Rodarte, C., Le Borgne, S., López-Munguía, A. (2002):** Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28(2): 112–117.
- O'Toole, P.W., Marchesi, J.R., Hill, C. (2017):** Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.*, 2(5): 1–6.
- Ozimek, L.K., Euverink, G.J.W., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2005):** Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett.*, 579(5): 1124–1128.
- Ozimek, L.K., Kralj, S., Kaper, T., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2006a):** Single amino acid residue changes in subsite – 1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized: altering inulosucrase processivity. *FEBS J.*, 273(17): 4104–4113.
- Ozimek, L.K., Kralj, S., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2006b):** The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.*, 152(4): 1187–9116.

- Paineau, D., Payen, F., Panserieu, S., Coulombier, G., Sobaszek, A., Lartigau, I., Brabet, M., Galmiche, J.-P., Tripodi, D., Sacher-Huvelin, S., Chapalain, V., Zourabichvili, O., Respondek, F., Wagner, A., Bornet, F.R.J. (2008): The effects of regular consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders. *Br. J. Nutr.*, 99(2): 311–318.
- Park, J.-P., Oh, T.-K., Yun, J.-W. (2001): Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Process Biochem.*, 37(5): 471–476.
- Parker, B.J., Wearsch, P.A., Veloo, A.C.M., Rodriguez-Palacios, A. (2020): The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front. Immunol.*, 11: 906.
- Pedersen, H.K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H.B., Hyotylainen, T., Nielsen, T., Jensen, B.A.H., Forslund, K., Hildebrand, F., Prifti, E., Falony, G., Le Chatelier, E., Levenez, F., Doré, J., Mattila, I., Plichta, D.R., Pöhö, P., Hellgren, L.I., Arumugam, M., Sunagawa, S., Vieira-Silva, S. *et al.* (2016): Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, 535(7612): 376–381.
- Peña-Cardena, A., Rodríguez-Alegría, M.E., Olvera, C., Munguía, A.L. (2015): Synthesis of fructooligosaccharides by IslA4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. *BMC Biotechnol.*, 15(1): 2.
- Pijning, T., Anwar, M.A., Böger, M., Dobruchowska, J.M., Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W. (2011): Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J. Mol. Biol.*, 412(1): 80–93.
- Pinelo, M., Jonsson, G., Meyer, A.S. (2009): Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. *Sep. Purif. Technol.*, 70(1): 1–11.
- Pohlentz, J.C., Gallala, N., Kosciow, K., Hövels, M. (2022): Growth behavior of probiotic microorganisms on levan- and inulin-based fructans. *J. Funct. Foods.*, 99: 105343.
- Ponstein, A.S., van Leeuwen, M.B. (1993): *In Vitro* synthesis of inulin by the inulosucrase from *Streptococcus mutans*. In: Fuchs, A. (ed.) *Studies in plant science*. Elsevier, pp. 281–287.
- Qiao, S., Bao, L., Wang, K., Sun, S., Liao, M., Liu, C., Zhou, N., Ma, K., Zhang, Y., Chen, Y., Liu, S.-J., Liu, H. (2020): Activation of a specific gut Bacteroides-folate-liver axis benefits for the alleviation of nonalcoholic hepatic steatosis. *Cell Rep.*, 32(6): 108005.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y. *et al.* (2010): A human gut microbial gene catalogue established by

- metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285): 59–65.
- Raga-Carbajal, E., López-Munguía, A., Alvarez, L., Olvera, C. (2018):** Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Sci. Rep.*, 8(1): 15035.
- Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H.G.H.J., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S., de Vos, W.M. (2011):** Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5): 1792–1801.
- Rakoff-Nahoum, S., Coyne, M.J., Comstock, L.E. (2014):** An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Curr. Biol.*, 24(1): 40–49.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., Louis, P. (2008):** Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.*, 101(4): 541–550.
- Ray, K. (2018):** Filling up on fibre for a healthy gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 15(2): 67.
- 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. *ISME J.*, 8(6): 1323-1335.
- Riccio, P., Rossano, R. (2020):** The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. *FEBS Lett.* 594(20): 3262–3271.
- Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A.E., Gibson, G.R. (1998):** The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.*, 128(1): 11–19.
- Roediger, W.E. (1980):** Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21(9): 793–798.
- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., Gómez-Zavaglia, A. (2016):** Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res. Int.*, 90: 251–258.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014):** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 5: 172.
- Rosero, J.A., Killer, J., Sechovcová, H., Mrázek, J., Benada, O., Fliegerová, K., Havlík, J., Kopečný, J. (1938):** Reclassification of *Eubacterium rectale* (Hauduroy et al. 1937) in a new genus *Agathobacter* gen. nov. as *Agathobacter rectalis* comb. nov., and description of *Agathobacter ruminis* sp. nov., isolated from the rumen contents of sheep and cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66(2): 768–773.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D. (2005):** Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(10): 6150–6158.

- Ryan, S.M., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. (2005):** Transcriptional regulation and characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7): 3475–3482.
- Saalman, R., Alderberth, I., Wold, A., Sjöberg, F. (2018):** Use of *Collinsella* for treatment of inflammatory bowel disease. U.S. Patent Application Nr. 15/510, 245.
- Sabater, C., Calvete-Torre, I., Villamiel, M., Moreno, F.J., Margolles, A., Ruiz, L. (2021):** Vegetable waste and by-products to feed a healthy gut microbiota: current evidence, machine learning and computational tools to design novel microbiome-targeted foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 118: 399–417.
- Sagheddu, V., Patrone, V., Miragoli, F., Puglisi, E., Morelli, L. (2016):** Infant early gut colonization by Lachnospiraceae: high frequency of *Ruminococcus gnavus*. *Front. Pediatr.*, 4: 57.
- Sakamoto, M., Kitahara, M., Benno, Y. (2007):** *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57(2): 293–296.
- Sakamoto, M., Sakurai, N., Tanno, H., Iino, T., Ohkuma, M., Endo, A. (2022):** Genome-based, phenotypic and chemotaxonomic classification of *Faecalibacterium* strains: proposal of three novel species *Faecalibacterium duncaniae* sp. nov., *Faecalibacterium hattorii* sp. nov. and *Faecalibacterium gallinarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 72(4): 005379.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A. (2017):** Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61(1): 1600240.
- Sánchez-Martínez, M.J., Soto-Jover, S., Antolinos, V., Martínez-Hernández, G.B., López-Gómez, A. (2020):** Manufacturing of short-chain fructooligosaccharides: from laboratory to industrial scale. *Food Eng. Rev.*, 12(2): 149–172.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G. (2005):** Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.*, 16(10): 442–457.
- Sanz, M.L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2005):** *In vitro* investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 53(8): 2914–2921.
- Saulnier, D.M., Riehle, K., Mistretta, T., Diaz, M., Mandal, D., Raza, S., Weidler, E.M., Qin, X., Coarfa, C., Milosavljevic, A., Petrosino, J.F., Highlander, S., Gibbs, R., Lynch, S.V., Shulman, R.J., Versalovic, J. (2011):** Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5): 1782–1791.
- Saulnier, D.M.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Kolida, S. (2007):** Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through

- microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6): 1753–1765.
- Schaafsma, G., Slavin, J.L. (2015):** Significance of inulin fructans in the human diet. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 14(1): 37–47.
- Schellinger, A.P., Carr, P.W. (2006):** Isocratic and gradient elution chromatography: a comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *J. Chromatogr. A.*, 1109(2): 253–266.
- Scher, J.U., Sczesnak, A., Longman, R.S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E.G., Abramson, S.B., Huttenhower, C., Littman, D.R., Mathis, D. (2013):** Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2:e01202.
- Schlinge, D., Scherpian, P., Schembecker, G. (2010):** Comparison of process concepts for preparative chromatography. *Chem. Eng. Sci.*, 65(19): 5373–5381.
- Schnorr, S.L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrioni, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini, M., Fiori, J., Gotti, R., De Bellis, G., Luiselli, D., Brigidi, P., Mabulla, A., Marlowe, F., Henry, A.G., Crittenden, A.N. (2014):** Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.*, 5(1): 3654.
- Schouler, C., Taki, A., Chouikha, I., Moulin-Schouleur, M., Gilot, P. (2009):** A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization. *J. Bacteriol.*, 191(1): 388–393.
- Scott, K.P., Martin, J.C., Campbell, G., Mayer, C.D., Flint, H.J. (2006):** Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium “*Roseburia inulinivorans*”. *J. Bacteriol.*, 188(12): 4340–4349.
- Scott, K.P., Martin, J.C., Duncan, S.H., Flint, H.J. (2014):** Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, *in vitro*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 87(1): 30–40.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016):** Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164(3): 337–340.
- Shapira, M. (2016):** Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. *Trends Ecol. Evol.*, 31(7): 539–549.
- Shapiro, J., Cohen, N.A., Shalev, V., Uzan, A., Koren, O., Maharshak, N. (2019):** Psoriatic patients have a distinct structural and functional fecal microbiota compared with controls. *J. Dermatol.*, 46(7): 595–603.
- Sheridan, P.O., Martin, J.C., Lawley, T.D., Browne, H.P., Harris, H.M.B., Bernalier-Donadille, A., Duncan, S.H., O’Toole, P.W., Scott, K.P., Flint, H.J. (2016):** Polysaccharide utilization loci

- and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microb. Genomics.*, 2(2): e000043.
- Shiloach, J., Fass, R. (2005):** Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.*, 23(5): 345–357.
- Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H.R., Shakeel, A., Ansari, A., Niazi, S. (2016):** Inulin: properties, health benefits and food applications. *Carbohydr. Polym.*, 147: 444–454.
- Singh, R.S., Chauhan, K., Kennedy, J.F. (2017):** A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 96: 312–322.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008):** Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite*, 51(3): 456–467.
- Smits, S.A., Leach, J., Sonnenburg, E.D., Gonzalez, C.G., Lichtman, J.S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Chagalucha, J., Elias, J.E., Dominguez-Bello, M.G., Sonnenburg, J.L. (2017):** Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*, 357(6353): 802–806.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. (2012):** Practical HPLC method development. *John Wiley & Sons*.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P. (2008):** *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(43): 16731–16736.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., Doré, J. (2009):** Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.*, 15(8): 1183–1189.
- Sonnenburg, E.D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S.K., Firbank, S.J., Bolam, D.N., Sonnenburg, J.L. (2010):** Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*, 141(7): 1241–1252.
- Splechna, B., Nguyen, T.-H., Zehetner, R., Lettner, H.P., Lorenz, W., Haltrich, D. (2007):** Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. J.*, 2(4): 480–485.
- Stribling, P., Ibrahim, F. (2023):** Dietary fibre definition revisited - the case of low molecular weight carbohydrates. *Clin. Nutr. ESPEN.*, 55: 340–356.



- Strube, C.P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz, D.W. (2011):** Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J. Biol. Chem.*, 286(20): 17593–17600.
- Sun, J., Liu, S., Ling, Z., Wang, F., Ling, Y., Gong, T., Fang, N., Ye, S., Si, J., Liu, J. (2019):** Fructooligosaccharides ameliorating cognitive deficits and neurodegeneration in APP/PS1 transgenic mice through modulating gut microbiota. *J. Agric. Food Chem.*, 67(10): 3006–3017.
- Swanson, K.S., de Vos, W.M., Martens, E.C., Gilbert, J.A., Menon, R.S., Soto-Vaca, A., Hautvast, J., Meyer, P.D., Borewicz, K., Vaughan, E.E., Slavin, J.I. (2020a):** Effect of fructans, prebiotics and fibres on the human gut microbiome assessed by 16S rRNA-based approaches: a review. *Benef. Microbes*, 11(2): 101–129.
- Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R., Reimer, R.A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K.P., Holscher, H.D., Azad, M.B., Delzenne, N.M., Sanders, M.E. (2020b):** The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 17(11): 687–701.
- Tan, H., Zhai, Q., Chen, W. (2019):** Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Res. Int.*, 116: 637–644.
- Tanaka, H., Zhou, X., Masayoshi, O. (2003):** Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 987(1): 119–125.
- Tanno, H., Chatel, J.-M., Martin, R., Mariat, D., Sakamoto, M., Yamazaki, M., Salminen, S., Gueimonde, M., Endo, A. (2023):** New gene markers for classification and quantification of *Faecalibacterium* spp. in the human gut. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 99(5): fiad035.
- Tanno, H., Fujii, T., Hirano, K., Maeno, S., Tonzuka, T., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Tochio, T., Endo, A. (2021):** Characterization of fructooligosaccharide metabolism and fructooligosaccharide-degrading enzymes in human commensal butyrate producers. *Gut Microbes.*, 13(1): 1869503.
- Tanoue, T., Morita, S., Plichta, D.R., Skelly, A.N., Suda, W., Sugiura, Y., Narushima, S., Vlamakis, H., Motoo, I., Sugita, K., Shiota, A., Takeshita, K., Yasuma-Mitobe, K., Riethmacher, D., Kaisho, T., Norman, J.M., Mucida, D., Suematsu, M., Yaguchi, T., Bucci, V. *et al.* (2019):** A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature.*, 565(7741): 600–605.
- Taras, D., Simmering, R., Collins, M.D., Lawson, P.A., Blaut, M. (2002):** Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52(2): 423–428.

- Tett, A., Huang, K.D., Asnicar, F., Fehlner-Peach, H., Pasolli, E., Karcher, N., Armanini, F., Manghi, P., Bonham, K., Zolfo, M., De Filippis, F., Magnabosco, C., Bonneau, R., Lusingu, J., Amuasi, J., Reinhard, K. Rattei, T., Boulund, F., Engstrand, L., Zink, A. et al. (2019):** The *Prevotella copri* complex comprises four distinct clades underrepresented in Westernized populations. *Cell Host Microbe*, 26(5): 666-679.e7.
- Thriene, K., Michels, K.B. (2023):** Human gut microbiota plasticity throughout the life course. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 20(2): 1463.
- Thursby, E., Juge, N. (2017):** Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.*, 474(11): 1823–1836.
- Toya, T., Corban, M.T., Marrietta, E., Horwath, I.E., Lerman, L.O., Murray, J.A., Lerman, A. (2020):** Coronary artery disease is associated with an altered gut microbiome composition. *PLoS ONE.*, 15(1): e0227147.
- Tripathi, N. (2009):** High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Def. Sci. J.*, 59(2): 137–146.
- Ulsemer, P., Toutounian, K., Kressel, G., Goletz, C., Schmidt, J., Karsten, U., Hahn, A., Goletz, S. (2016):** Impact of oral consumption of heat-treated *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 on the level of natural TFA-specific antibodies in human adults. *Benef. Microbes.*, 7(4): 485–500.
- Ulsemer, P., Toutounian, K., Kressel, G., Schmidt, J., Karsten, U., Hahn, A., Goletz, S. (2012):** Safety and tolerance of *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 in healthy adults. *Benef. Microbes.*, 3(2): 99–111.
- Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F.M., Portincasa, P., Gobbetti, M., De Angelis, M. (2020):** The controversial role of human gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4): 573.
- Valcheva, R., Koleva, P., Martínez, I., Walter, J., Gänzle, M.G., Dieleman, L.A. (2019):** Inulin-type fructans improve active ulcerative colitis associated with microbiota changes and increased short-chain fatty acids levels. *Gut Microbes*, 10(3): 334–357.
- Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E., Spector, T.D. (2018):** Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ.*, 361: k2179.
- Van den Ende, W., Öner, E.T. (2023):** Chapter 19 - fructans for life: conclusions and perspectives. In: Van den Ende, W., Öner, E.T. (eds.) *The book of fructans*. pp. 333–8.
- van Hijum, S.A.F.T., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2002):** Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(9): 4390–4398.
- van Hijum, S.A.F.T., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. (2003):** Kinetic properties of an

- inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett.*, 534(1–3): 207–210.
- Van Laere, K.M.J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (2000):** Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 48(5): 1644–1652.
- Vangay, P., Johnson, A.J., Ward, T.L., Al-Ghalith, G.A., Shields-Cutler, R.R., Hillmann, B.M., Lucas, S.K., Beura, L.K., Thompson, E.A., Till, L.M., Batres, R., Paw, B., Pergament, S.L., Saenyakul, P., Xiong, M. Kim, A.D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E.C., Angkurawaranon, C. et al. (2018):** US immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell*, 175(4): 962-972.e10.
- Verbrugghe, P., Brynjólfsson, J., Jing, X., Björck, I., Hållenius, F., Nilsson, A. (2021):** Evaluation of hypoglycemic effect, safety and immunomodulation of *Prevotella copri* in mice. *Sci. Rep.*, 11(1): 21279.
- Versluys, M., Porrás-Domínguez, J.R., De Coninck, T., Van Damme, E.J.M., Van den Ende, W. (2022):** A novel chicory fructanase can degrade common microbial fructan product profiles and displays positive cooperativity. *J. Exp. Bot.*, 73(5): 1602–1622.
- Verstraeten, S., Layec, S., Auger, S., Juste, C., Henry, C., Charif, S., Jaszczyszyn, Y., Sokol, H., Beney, L., Langella, P., Thomas, M., Huillet, E. (2023):** *Faecalibacterium duncaniae* A2-165 regulates the expression of butyrate synthesis, ferrous iron uptake, and stress-response genes based on acetate consumption. Preprint (version 2) available at <https://www.researchsquare.com/article/rs-2481125/v2>.
- Vijn, I., Smeekens, S. (1999):** Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.*, 120(2): 351–360.
- Vitaglione, P., Mennella, I., Ferracane, R., Rivellese, A.A., Giacco, R., Ercolini, D., Gibbons, S.M., La Storia, A., Gilbert, J.A., Jonnalagadda, S., Thielecke, F., Gallo, M.A., Scalfi, L., Fogliano, V. (2015):** Whole-grain wheat consumption reduces inflammation in a randomized controlled trial on overweight and obese subjects with unhealthy dietary and lifestyle behaviors: role of polyphenols bound to cereal dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.*, 101(2): 251–261.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., Ramasamy, U., Schols, H.A., de Vos, P. (2015):** Immunological properties of inulin-type fructans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 55(3): 414–436.
- Vogt, L., Ramasamy, U., Meyer, D., Pullens, G., Venema, K., Faas, M.M., Schols, H.A., de Vos, P. (2013):** Immune modulation by different types of  $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1-fructans is toll-like receptor dependent. *PLoS ONE.*, 8(7): e68367.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M.M., Venema, K., Ramasamy, U., Schols, H.A., de Vos, P. (2014):** Toll-like receptor 2 activation by  $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1-fructans protects barrier function of T84

- human intestinal epithelial cells in a chain length–dependent manner. *J. Nutr.*, 144(7): 1002–1008.
- Wada, T., Ohguchi, M., Iwai, Y. (2003):** A novel enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 that produces inulin from sucrose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(6): 1327–1334.
- Waidmann, M., Bechtold, O., Frick, J., Lehr, H., Schubert, S., Dobrindt, U., Loeffler, J., Bohn, E., Autenrieth, I.B. (2003):** *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, 125(1): 162–177.
- Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Parkhill, J., Flint, H.J. (2011):** Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.*, 5(2): 220–230.
- Walter, J., Armet, A.M., Finlay, B.B., Shanahan, F. (2020):** Establishing or exaggerating causality for the gut microbiome: lessons from human microbiota-associated rodents. *Cell*, 180(2): 221–232.
- 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 Rep.*, 26(1): 222-235.e5.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., Zhao, L. (2012):** Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.*, 6(2): 320–329.
- Wang, Y., Zeng, T., Wang, S., Wang, W., Wang, Q., Yu, H.-X. (2010):** Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. *Nutrition*, 26(3): 305–311.
- Wang, Z., Tauzin, A.S., Laville, E., Tedesco, P., Létisse, F., Terrapon, N., Leperq, P., Mercade, M., Ptoocki-Veronese, G. (2020):** Harvesting of prebiotic fructooligosaccharides by nonbeneficial human gut bacteria. *mSphere*, 5(1): e00771-19.
- Wanker, E., Huber, A., Schwab, H. (1995):** Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5): 1953–1958.
- Welters, C.F.M., Heineman, E., Thunnissen, F.B.J.M., van den Bogaard, A.E.J.M., Soeters, P.B., Baeten, C.G.M.I. (2002):** Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Dis. Colon Rectum.*, 45(5): 621–627.
- Wienberg, F. (2019):** Produktion, Aufreinigung und Charakterisierung verschiedener Inulosucrasen aus der Gattung *Lactobacillus*. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-

Universität Bonn.

- Wienberg, F., Hövels, M., Kosciow, K., Deppenmeier, U. (2021):** High-resolution method for isocratic HPLC analysis of inulin-type fructooligosaccharides., *J. Chromatogr. B.*, 1172: 122505.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. (2001):** High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.*, 73(2): 95–103.
- Wilson, B., Whelan, K. (2017):** Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 32(S1): 64–68.
- Wiśniewski, Ł., Antořová, M., Polakovič, M. (2013):** Simulated moving bed chromatography separation of galacto-oligosaccharides. *Acta Chim. Slovaca.*, 6(2): 206–210.
- Wong, V.W.-S., Tse, C.-H., Lam, T.T.-Y., Wong, G.L.-H., Chim, A.M.-L., Chu, W.C.-W., Yeung, D.K.-W., Law, P. T.-W., Kwan, H.-S., Yu, J., Sung, J.J.-Y., Chan, H.L.-Y. (2013):** Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis – a longitudinal study. *PLoS ONE.*, 8(4): e62885.
- Woting, A., Blaut, M. (2016):** The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients*, 8(4): 202.
- Xu, M., Lan, R., Qiao, L., Lin, X., Hu, D., Zhang, S., Yang, J., Zhou, J., Ren, z., Li, X., Liu, G., Liu, L., Xu, J. (2023):** *Bacteroides vulgatus* ameliorates lipid metabolic disorders and modulates gut microbial composition in hyperlipidemic rats. *Microbiol. Spectr.*, 11(1): e02517-22.
- Xu, W., Ni, D., Zhang, W., Guang, C., Zhang, T., Mu, W. (2018):** Recent advances in levansucrase and inulosucrase: evolution, characteristics, and application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 59(22): 3630-3647.
- Yan, C., Zhang, S., Wang, C., Zhang, Q. (2019):** A fructooligosaccharide from *Achyranthes bidentata* inhibits osteoporosis by stimulating bone formation. *Carbohydr. Polym.*, 210: 110–118.
- Yasuma, T., Toda, M., Abdel-Hamid, A.M., D’Alessandro-Gabazza, C., Kobayashi, T., Nishihama, K., D’Alessandro, V.F., Pereira, G.V., Mackie, R.I., Gabazza, E.C., Cann, I. (2021):** Degradation products of complex arabinoxylans by *Bacteroides intestinalis* enhance the host immune response. *Microorganisms*, 9(6): 1126.
- Yatsunenکو, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I. (2012):** Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402): 222–227.

- Yoon, S.-H., Mukerjea, R., Robyt, J.F. (2003):** Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydr. Res.*, 338(10): 1127–1132.
- Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H.Z., Hirota, Y., Ogawa, W., Yamada, T., Hirata, K.-I. (2018):** *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation*, 138(22): 2486–2498.
- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H., Fujii, T. (2008):** Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.*, 30(3): 535–539.
- Yun, J.W. (1996):** Fructooligosaccharides — occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb. Technol.*, 19(2): 107–117.
- Zeng, H., Umar, S., Rust, B., Lazarova, D., Bordonaro, M. (2019):** Secondary bile acids and short chain fatty acids in the colon: a focus on colonic microbiome, cell proliferation, inflammation, and cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(5): 1214.
- Zeng, W., Leng, S., Zhang, Y., Chen, G., Liang, Z. (2022):** Development of new strategies for the production of high-purity fructooligosaccharides using  $\beta$ -fructofuranosidase and a novel isolated *Wickerhamomyces anomalus*. *Sep. Purif. Technol.*, 284: 120236.
- Zhang, W., Xu, W., Ni, D., Dai, Q., Guang, C., Zhang, T., Mu, W. (2019):** An overview of levan-degrading enzyme from microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103(19): 7891–7902.
- Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y.Y., Wang, X., Fu, H., Xue, X., Lu, C., Ma, J., Yu, L., Xu, C., Ren, Z., Xu, Y., Xu, S., Shen, H. Zhu, X., Shi, Y., Shen, Q., Dong, W. et al. (2018):** Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*, 359(6380): 1151–1156.
- Zhou, L., Ni, H., Zhang, L., Wu, W., Zhang, T., Su, Q., Zhou, J., Long, H., Hou, J., Gong, J., Wu, W. (2022):** Calculating relative correction factors for quantitative analysis with HILIC-HPLC-ELSD method: eight fructooligosaccharides of *Morinda Officinalis* as a case Study. *J. Anal. Methods Chem.*, 2022: e8022473.
- Zmora, N., Zeevi, D., Korem, T., Segal, E., Elinav, E. (2016):** Taking it personally: personalized utilization of the human microbiome in health and disease. *Cell Host Microbe.*, 19(1): 12–20.
- Zuo, T., Zhang, F., Lui, G.C.Y., Yeoh, Y.K., Li, A.Y.L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A.C.K., Cheung, C.P., Chen, N., Lai, C.K.C., Chen, Z., Tso, E.Y.K., Fung, K.S.C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D.S.C., Chan, F.K.L., Chan, P.K.S., Ng, S.C. (2020):** Alterations in fecal fungal microbiome of patients with COVID-19 during time of hospitalization until discharge. *Gastroenterology*, 159(4): 1302-1310.e5.

## 7 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meine Dankbarkeit gegenüber all den Menschen ausdrücken, die dazu beigetragen haben, meine Doktorarbeit erfolgreich abzuschließen.

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Uwe Deppenmeier meinen Dank dafür aussprechen, dass er mir dieses spannende und anwendungsbezogene Promotionsprojekt bereitgestellt hat und mich während des gesamten Forschungsprozesses als Betreuer begleitet hat. Ihre ständige Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen und Ihre wertvollen Ratschläge waren von entscheidender Bedeutung für den Fortschritt meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Frau PD Dr. Christiane Dahl, die freundlicherweise das Zweitgutachten übernommen hat. Ich danke Ihnen für den angenehmen und konstruktiven Umgang und Ihren bewundernswerten Einsatz, Studierende und Promovierende auf ihrem Weg zu unterstützen.

Mein aufrichtiger Dank geht auch an Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger, die als fachnahes und fachfremdes Mitglied der Promotionskommission meine Arbeit bewerten.

Herrn Dr. Marcel Hövels und Frau Joana Pohlentz danke ich für die Herstellung und Bereitstellung des Levans und der L-FOS.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Deppenmeier. Marcel, Paulina, Mélanie, Rebecca, André, Konrad, Natalie Hager, Natalie Thum-Schmitz, Nicole, Juliane, Thomas und Anna, eure Unterstützung im Laboralltag, die starke Gemeinschaft und die schönen gemeinsamen Momente, sei es bei der Arbeit oder bei gemeinsamen Spieleabenden, haben dafür gesorgt, dass ich stets mit Freude zur Arbeit gegangen bin. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinen Post-Docs Konrad und Marcel bedanken, die mich beide mit ihrer positiven Art immer wieder motivieren und für die Forschung begeistern konnten. Marcel, vielen Dank, dass Du mir Dein Fachwissen mit so viel Freude nähergebracht hast und mich immer mit Ideen und Tipps unterstützt hast.

Zudem bedanke ich mich bei allen weiteren Mitgliedern des IfMB für die offene Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir stets den Rücken gestärkt haben. Eure langjährige Unterstützung und Ermutigung haben mir dabei geholfen, diesen Meilenstein zu erreichen.