

# **Optimierung der mikrobiellen Produktion von präbiotischen Zuckerderivaten auf Levan-Basis**

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Marcel Hövels**

aus

Bonn

Bonn, 2020

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

2. Gutachter: PD Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 23.02.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Hövels, M., Kosciow, K. & Deppenmeier, U.\* (2020).** Characterization of a novel endo-levanase from *Azotobacter chroococcum* DSM 2286 and its application for the production of prebiotic fructooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*.

**Hövels, M., Kosciow, K., Kniewel, J. & Deppenmeier, U.\* (2020).** High yield production of levan-type Fruktans by *Gluconobacter japonicus* LMG 1417. *International Journal of Biological Macromolecules*.

**Deppenmeier, U., Hövels, M. & Kosciow, K. (2020).** Enzymatic production of levan-based, prebiotic Fruktooligosaccharides. *Europäisches Patentregister* (PCT/EP2020/067447).

**Hoffmann, J. J., Hövels, M., Kosciow, K. & Deppenmeier, U.\* (2019).** Synthesis of the alternative sweetener 5-ketoFruktose from sucrose by Fruktose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *Journal of biotechnology*.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1. Einleitung .....	1
1.1 Präbiotika – Definition und Bedeutung.....	1
1.2 Fruktane und Fruktooligosaccharide .....	2
1.3 Levan und Levan-FOS .....	3
1.4 Levansucrasen und Endolevanasen .....	4
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	6
2. Material und Methoden .....	7
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	7
2.1.1 Antibiotika.....	7
2.1.2 Zusätze.....	7
2.1.3 Molekularbiologische Kits .....	7
2.1.4 Marker für die Gel-Elektrophorese.....	8
2.1.5 Software und Browser-basierte Tools .....	8
2.2 Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer .....	10
2.2.1 Organismen .....	10
2.2.2 Oligonukleotidprimer .....	10
2.2.3 Vektoren und Plasmide.....	12
2.3 Mikrobiologische Methoden .....	14
2.3.1 Kultivierung von Vertretern der Gattung <i>Gluconobacter</i> .....	14
2.3.2 Fermentation von <i>Gluconobacter japonicus</i> LMG 1417 und <i>Gluconobacter japonicus</i> LMG 1417 pBBR1_p264_levS1417 .....	14
2.3.3 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von <i>G. japonicus</i> LMG 1417 und <i>G. japonicus</i> pBBR1_p264_levS1417.....	15
2.3.4 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.3.5 Stammhaltung von Mikroorganismen .....	16
2.3.6 Bestimmung von mikrobiellen Wachstumsparametern.....	16
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA .....	17
2.4.2 Isolierung von genomischer DNA.....	17
2.4.3 Photometrische Quantifizierung von DNA .....	17
2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	17
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	19
2.4.6 Enzymatische Modifikation von DNA.....	20
2.4.7 DNA-Sequenzierung .....	23
2.4.8 Hitzeschock-Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	23
2.4.9 Elektroporation von <i>Gluconobacter japonicus</i> LMG 1417.....	24
2.4.10 Genomische Integration in <i>E. coli</i> BW 25113.....	24
2.5 Proteinbiochemische Methoden .....	27

2.5.1	Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	27
2.5.2	Proteinquantifizierung nach Bradford .....	28
2.5.3	Auftrennung und Visualisierung von Proteinen .....	28
2.5.4	Silberfärbung .....	29
2.5.5	Immunologische Proteindetektion mittels Western Blot.....	29
2.6	Synthese und Aufreinigung von Zuckerverbindungen .....	30
2.6.1	Produktion und Aufreinigung des durch <i>G. japonicus</i> LMG 1417 produzierten EPS .....	30
2.6.2	Synthese und Aufreinigung von Levan .....	31
2.6.3	Synthese und Aufreinigung von RBB-Levan.....	31
2.7	Analytische Methoden.....	32
2.7.1	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie .....	32
2.7.2	Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie .....	32
2.7.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	33
2.7.4	Molekulargewichtsbestimmung von Levan mittels asymmetrischer Flussfeld-Fluss-Fraktionierung .....	35
2.8	Enzymatische Nachweismethoden .....	35
2.8.1	Quantifizierung von Enzymaktivitäten.....	35
2.8.2	Enzymatischer Nachweis von Glukose .....	36
2.8.3	Enzymatische Reinheitskontrolle im Zuge der Zellfraktionierung .....	37
2.8.4	RBB-Levan basierte Aktivitätsbestimmung von Endolevanasen.....	38
3.	Ergebnisse .....	39
3.1	Identifizierung von Levan-Produzenten innerhalb der Gattung <i>Gluconobacter</i> .....	39
3.1.1	Screening nach EPS-produzierenden <i>Gluconobacter</i> Arten.....	39
3.1.2	Identifizierung des durch <i>G. japonicus</i> LMG 1417 produzierten EPS.....	40
3.2	Charakterisierung der Levansucrase aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 .....	43
3.2.1	Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Levansucrase LevS1417.....	43
3.2.2	Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Levansucrase LevS1417 .....	45
3.2.3	<i>In-vitro</i> -Levanproduktion durch die rekombinante Levansucrase LevS1417 .....	46
3.3	Optimierung der Levan-Produktion durch <i>G. japonicus</i> LMG 1417 .....	48
3.3.1	Homologe Expression der Levansucrase LevS1417 in <i>G. japonicus</i> LMG 1417 .....	48
3.3.2	<i>G. japonicus</i> LMG 1417 vs. <i>G. japonicus</i> LMG 1417 pBBR1_p264_levS1417: Batch-Kultivierung.....	51
3.3.3	Charakterisierung der potenziellen Levansucrase aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 .....	53
3.3.4	Fermentation von <i>G. japonicus</i> LMG 1417 und dem erstellten Überexpressionsstamm.....	58
3.3.5	Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von <i>G. japonicus</i> LMG 1417.....	59
3.4	Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahrens zur Analyse von Fruktooligosacchariden .....	62
3.4.1	Chromatographische FOS-Analytik durch Polymer-basierte Aminex-Trennsäulen.....	63
3.4.2	Chromatographische FOS-Analytik durch Aminophasen-Trennsäulen.....	64
3.5	Charakterisierung von Endolevanasen für die Produktion von Fruktooligosacchariden .....	68
3.5.1	Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Endolevanasen.....	68

3.5.2 Produktspektren der rekombinanten Endolevanasen.....	70
3.5.3 Enzymatische Charakterisierung der Endolevanase LevB <sub>2286</sub> aus <i>A. chroococcum</i> DSM 2286 .....	77
3.6 Extrakt-basierte Produktion von Levan-artigen Fruktooligosacchariden.....	78
3.6.1 Performance verschiedener Endolevanasen in Extrakt-basierten Assays.....	78
3.6.2 Produktion von Levan-FOS durch den Einsatz von Levansucrase- und Endolevanase-haltigen Extrakten (2-Stamm-System) .....	79
3.6.3 Produktion von Levan-FOS durch den Einsatz eines Levansucrase- und Endolevanase-haltigen Extraktes (1-Stamm-System).....	81
3.6.4 Optimierung der Extrakt-basierten FOS-Produktion.....	85
3.6.5 Integration der Levansucrase- und Endolevanase-kodierenden Gene in das Genom von <i>E. coli</i> BW25113.....	88
4. Diskussion .....	92
4.1 Identifizierung eines geeigneten Levan-Produzenten.....	92
4.1.1 <i>Gluconobacter</i> sp. – Plattform für die Levanproduktion.....	93
4.1.2 Charakterisierung der rekombinanten Levansucrase LevS1417 .....	95
4.1.3 <i>In-vivo</i> -Produktion Levan-basierter Fruktane durch <i>G. japonicus</i> LMG 1417 .....	101
4.1.4 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von <i>G. japonicus</i> LMG 1417.....	106
4.2 Charakterisierung Levan-abbauender Enzyme.....	110
4.2.1 RBB-Levan – Substrat zur Charakterisierung von Endolevanasen.....	110
4.2.2 Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahrens zur Analyse von Fruktooligosacchariden .....	113
4.2.3 Produktspektren rekombinanter Endolevanasen .....	115
4.3 Extrakt-basierte Produktion Levan-basierter FOS .....	118
4.3.1 Extrakt-basierte Produktion Levan-artiger FOS.....	118
4.3.2 2-Stamm-System: Extrakt-basierte Produktion Levan-artiger FOS aus Saccharose.....	119
4.3.3 1-Stamm-System: Extrakt-basierte Produktion Levan-artiger FOS aus Saccharose.....	120
4.3.4 Optimierung regulatorischer Plasmid-Elemente zur Steigerung rekombinanter Proteinausbeuten .....	124
4.3.5 Integration des Gens <i>levS1417</i> in das Genom von <i>E. coli</i> BW25113 .....	125
4.4 Präbiotika und Probiotika – Eine Übersicht .....	125
4.4.1 Probiotika .....	126
4.4.2 Präbiotika.....	132
4.4.3 Synbiotika.....	136
5. Zusammenfassung .....	138
6. Literaturverzeichnis.....	140
7. Danksagung .....	169
8. Publikationsliste .....	171

# Abkürzungsverzeichnis

---

## %

% [v/v] · *Volumenprozent*  
 % [w/v] · *Gewichtsprozent*

---

## Δ

ΔE · *Extinktionsänderung*

---

## •

°C · *Grad Celsius*

---

## μ

μ · *Wachstumsrate*  
 μg · *Mikrogramm*  
 μl · *Mikroliter*  
 μm · *Mikrometer*  
 μM · *Mikromolar*

---

## A

A · *Absorption*  
 ADP · *Adenosindiphosphat*  
 AgNO<sub>3</sub> · *Silbernitrat*  
 AHT · *Anhydrotetrazyklin*  
 Amp<sup>R</sup> · *Ampicillinresistenz*  
 APS · *Ammoniumperoxodisulfat*  
 ATCC · *American Type Culture Collection*  
 ATP · *Adenosintriphosphat*

---

## B

BCCM · *Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms*  
 BHI · *Brain-Heart-Infusion*  
 BSA · *Bovines Serumalbumin*

---

## C

CaCl<sub>2</sub> · *Calciumchlorid*  
 Car<sup>R</sup> · *Carbenicillinresistenz*  
 Cef<sup>R</sup> · *Cefoxitinresistenz*  
 CIP · *Calf-Intestinal-Phosphatase*  
 cm · *Zentimeter*  
 Cm<sup>R</sup> · *Chloramphenicolresistenz*  
 CV · *Säulenvolumen*

---

## D

d · *Schichtdicke*  
 DNA · *Desoxyribonukleinsäure*  
 dNTPs · *Deoxynukleosidtriphosphate*

DP · *Polymerisierungsgrad*  
 Dr. rer. Nat. · *Doctor rerum naturalium*  
 DSMZ · *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

---

## **E**

EBI · *European Bioinformatics Institute*  
 EC · *Enzymklasse*  
 EDTA · *Ethylendiamintetraessigsäure*  
 EMBL · *Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie*  
 EPS · *Extrazelluläres Polysaccharid*  
*et al.* · *und andere*  
 EU · *Europäische Union*

---

## **F**

FAO · *Food and Agricultural Organization*  
 FISH · *Fluoreszierende in situ Hybridisierung*  
 FOS · *Fruktooligosaccharide*  
 FTIR · *Fourier-Transform-Infrarot*

---

## **G**

g · *Gramm*  
 G6PDH · *Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase*  
 GFP · *Grün fluoreszierendes Protein*  
 GmbH · *Gesellschaft mit beschränkter Haftung*  
 GMO · *Genetisch modifizierter Organismus*  
 GOS · *Galaktooligosaccharide*  
 gRNA · *Guide-RNA*

---

## **H**

h · *Stunden*  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · *Wasserstoffperoxid*  
 H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> · *Demineralisiertes Wasser*  
 H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> · *Reinstwasser*  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · *Schwefelsäure*  
 HCl · *Chlorwasserstoff*  
 HEPES · *2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure*  
 HiFi · *High Fidelity*  
 HILIC · *Hydrophilic Interaction Chromatography*  
 HMW · *High Molecular Weight*  
 HPAEC-PAD · *Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion*  
 HPLC · *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*  
 HRP · *Meerrettich-Peroxidase*

---

## **I**

IBD · *entzündlichen Darmerkrankungen*  
 IC · *Ionenchromatographie*  
 Inc · *Incorporated*  
 IPTG · *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid*  
 ISAPP · *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*

---

## **K**

Kan<sup>R</sup> · *Kanamycinresistenz*  
 kb · *Kilobasen*  
 KBE · *Kolonien-bildende Einheiten*



KBr · *Kaliumbromid*  
 K<sub>cat</sub> · *Wechselzahl*  
 KCl · *Kaliumchlorid*  
 kDa · *Kilodalton*  
 KEGG · *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*  
 KF · *Keim-freie*  
 KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · *Kaliumdihydrogenphosphat*  
 KLD · *Kinase-Ligase-DpnI*  
 KLS · *Konjugierte Linolsäuren*  
 K<sub>m</sub> · *Michaeliskonstante*  
 kV · *Kilovolt*

---

## L

L · *Liter*  
 LB · *Lysogeny Broth*  
 LLC · *Limited Liability Company*  
 LMW · *Low Molecular Weight*

---

## M

M · *Molar*  
 MALLS · *Mehrwinkel-Laserlichtstreuung*  
 MES · *2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure*  
 MgCl<sub>2</sub> · *Magnesiumchlorid*  
 MgSO<sub>4</sub> · *Magnesiumsulfat*  
 MHz · *Megahertz*  
 min · *Minute*  
 ml · *Milliliter*  
 mm · *Millimeter*  
 mM · *Millimolar*  
 mol · *Stoffmenge*  
 MOS · *Maltooligosaccharide*  
 ms · *Millisekunde*

---

## N

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · *Natriumcarbonat*  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · *Dinatriumhydrogenphosphat*  
 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · *Natriumthiosulfat*  
 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · *Trinatriumphosphat*  
 NaCl · *Natriumchlorid*  
 NADPH · *Nicotinamidadeninukleotidphosphat*  
 NaNO<sub>3</sub> · *Natriumnitrat*  
 NaOH · *Natriumhydroxid*  
 NCBI · *National Center for Biotechnology Information*  
 NEB · *New England Biolabs*  
 NEEO · *Niedrige Elektroendosmose*  
 ng · *Nanogramm*  
 nm · *Nanometer*  
 NMR · *Kernspinresonanz*  
 NPC · *Normal-Phasen-Chromatographie*  
 Nr · *Nummer*

---

## O

OD · *Optische Dichte*  
 OH · *Hydroxyl*  
 optRBS · *optimierte Ribosomenbindestelle*  
 OV · *Oberer Verdauungstrakt*

---

**P**

PBS · *Phosphatgepufferte Salzlösung*  
PCR · *Polymerase-Kettenreaktion*  
PEG · *Polyethylenglykol*  
PES · *Polyethersulfon*  
pH · *negativer dekadischer Logarithmus der H<sup>+</sup>-Konzentration*  
pmol · *Pikomol*  
ppm · *Parts per million*  
*Pty Ltd* · *proprietary limited*  
PUFS · *Poly-ungesättigte Fettsäuren*  
PVDF · *Polyvinylidenfluorid*

---

**R**

R<sup>2</sup> · *Bestimmtheitsmaß*  
RBB · *Remazol Brilliant Blau R*  
RBS · *Ribosomenbindestelle*  
RCT · *Randomisierte kontrollierte Studie*  
RID · *Brechungsindex-Detektor*  
rms · *Quadratischer Mittelwert*  
RNAP · *RNA-Polymerase*  
RPC · *Reverse-Phasen-Chromatographie*  
rpm · *Umdrehungen pro Minute*  
RT · *Raumtemperatur*

---

**S**

SCFA · *Kurzkettige Fettsäuren*  
SDS-PAGE · *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*  
SMB · *Simulated Moving Bed*  
SOC · *Super-Optimaler Broth mit Katabolitrepession*  
spp. · *species pluralis*

---

**T**

T<sub>A</sub> · *Annealingtemperatur*  
TAE · *TRIS-Acetat-EDTA*  
TAT · *Twin Arginine Translocation*  
t<sub>d</sub> · *Verdopplungszeit*  
TEMED · *Tetramethylethylendiamin*  
Tet<sup>R</sup> · *Tetrazyklinresistenz*  
T<sub>M</sub> · *Schmelztemperatur*  
Tris · *Tris(hydroxymethyl)aminomethan*

---

**U**

U · *Units*  
US\$ · *US Dollar*  
UTR · *Untranslatierte Region*  
UV · *Ultraviolett*

---

**V**

V · *Volt*  
V<sub>max</sub> · *Maximale Umsatzgeschwindigkeit*

---

**W**

WHO · *Weltgesundheitsorganisation*

---

**X**

XOS · *Xylooligosaccharide*

---

**Ω**

Ω · *Ohm*

# 1. Einleitung

## 1.1 Präbiotika – Definition und Bedeutung

Vor mehr als einem Jahrhundert, im Jahr 1907, veröffentlichte der russische Bakteriologe und Immunologe Elias Metchnikoff sein Buch „The Prolongation of Life“ (Metchnikoff 1907). In diesem Werk beschrieb er eine interessante Beobachtung, mit der er, wie sich später herausstellte, den Grundstein für das probiotische Konzept legte. Metchnikoff verknüpfte die überdurchschnittlich hohe Lebenserwartung bulgarischer Bauern mit dem regelmäßigen Verzehr von Milchsäurebakterien in Form von fermentierten Milchprodukten. Aufbauend auf der Entdeckung des „bulgarischen Bazillus“ durch den bulgarischen Arzt Stamen Grigorov untersuchte Metchnikoff, wie bestimmte Mikroorganismen zu einer Verbesserung der Verdauung und des Immunsystems beitragen. Er postulierte: "The dependence of the intestinal microbes on the food makes it possible to adopt measures to modify the flora in our bodies and to replace the harmful microbes by useful microbes" (Metchnikoff 1907). Bis zum heutigen Tag konnte sich das probiotische Konzept bewähren und wurde durch zahlreiche Studien untermauert (Fuller 1991; Williams 2010; Hill et al. 2014), was dazu führte, dass sich ein rapide wachsender Markt für Probiotika entwickelte, der im Jahr 2016 auf 35,9 Milliarden US\$ geschätzt wurde.

Fast 90 Jahre nach der Veröffentlichung von „The Prolongation of Life“ führten die Forscher Glenn R. Gibson und Marcel B. Roberfroid in der Publikation „Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics“ das präbiotische Konzept ein (Gibson & Roberfroid 1995). Präbiotika sind definiert als Substrate, die selektiv von Wirtsmikroorganismen genutzt werden und einen gesundheitlichen Nutzen bringen (Gibson et al. 2017). Bei diesen Substraten handelt es sich in der Regel um unverdauliche Lebensmittelbestandteile, die durch eine Modulation der humanen Darm-Mikrobiota positive physiologische Effekte vermitteln und aktiv zur Bekämpfung Darm-assoziiierter Krankheiten eingesetzt werden können (Ewaschuk & Dieleman 2006; Sanders et al. 2019). Das präbiotische Konzept von Gibson und Roberfroid erweitert das probiotische Konzept von Metchnikoff zu einem ganzheitlichen Konzept, das die enge Wechselwirkung zwischen Substrat und Organismus aufgreift. Wie Abbildung 1 verdeutlicht, wird die humane Mikrobiota durch eine Vielzahl von Verbindungen aus verschiedensten Stoffklassen beeinflusst. Das kritische Merkmal der selektiven Verwertung konnte nur für einen Teil dieser Verbindungen nachgewiesen werden, weshalb die Gruppe der akzeptierten Präbiotika bis dato überschaubar ist. Aktuell erfüllen lediglich folgende Substanzen die für die Einstufung als Präbiotikum notwendigen Kriterien: Galaktooligosaccharide (GOS), Fruktooligosaccharide (FOS), Inulin und Lactulose (Scott et al. 2020). Andere fermentierbare Kohlenhydrate wie Xylooligosaccharide (XOS), Maltooligosaccharide (MOS), Lactosucrose und Palatinose sind vielversprechende präbiotische Kandidaten (Joshi et al. 2018). Die Selektivität präbiotischer Verbindungen bezog sich lange Zeit ausschließlich auf Vertreter der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*. Durch moderne, molekularbiologische Methoden konnte die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmgemeinschaft besser beleuchtet werden

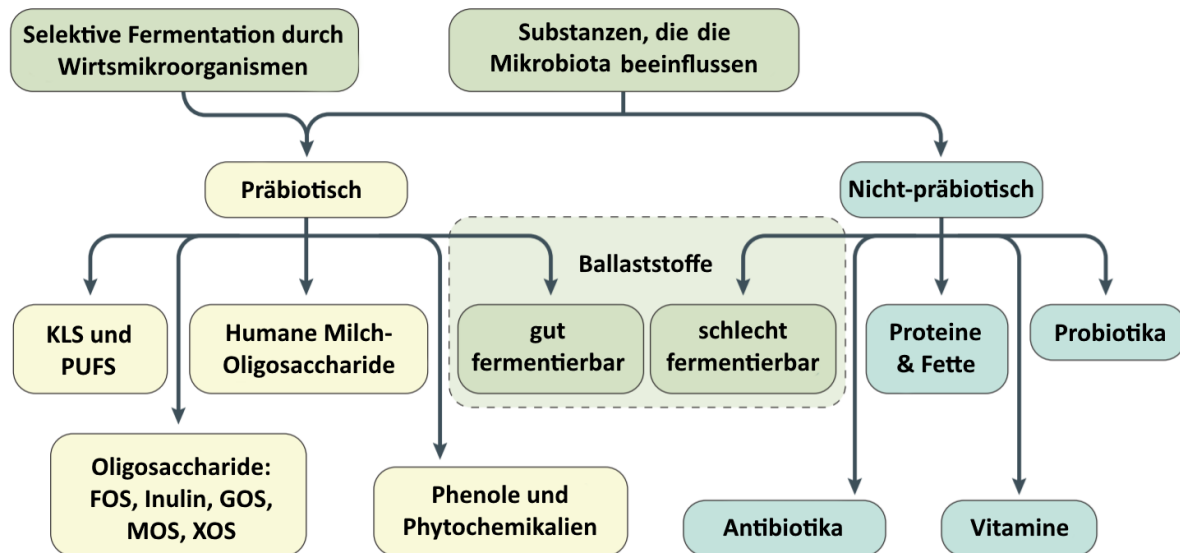


Abbildung 1: Graphische Übersicht von präbiotischen und nicht-präbiotischen, Darm-assoziierten Verbindungen. Die Abbildung zeigt sowohl akzeptierte Präbiotika als auch präbiotische Kandidaten. KLS, konjugierte Linolsäuren; PUFS, poly-ungesättigte Fettsäuren; FOS, Fruktooligosaccharide; GOS, Galactooligosaccharide; MOS, Mannanoligosaccharide; XOS, Xylooligosaccharide. Entnommen aus Gibson *et. al* 2017, modifiziert nach Hövels.

Dies führte zur Identifizierung zahlreicher bakterieller Gattungen, die ebenfalls selektiv in ihrem Wachstum oder ihrer Aktivität begünstigt werden können und gesundheitsfördernde Effekte vermitteln. Daher ist mittlerweile anerkannt, dass sich der präbiotische Effekt über die Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* hinaus auf weitere Vertreter der humanen Mikrobiota erstreckt (Gibson *et al.* 2017).

## 1.2 Fruktane und Fruktooligosaccharide

Fruktane sind natürliche Polymere, die überwiegend aus verknüpften  $\beta$ -D-Fruktose-Einheiten bestehen. Basierend auf dem Verknüpfungstyp der Fruktosyl-Einheiten werden die Polymere in Fruktane vom Inulin-Typ ( $\beta$ -2,1-Verknüpfung; Kelly 2008; Kelly 2009), Levan-Typ ( $\beta$ -2,6-Verknüpfung; Öner *et al.* 2016), Graminan-Typ ( $\beta$ -2,1- und  $\beta$ -2,6-Verknüpfungen; Kawakami and Yoshida 2005) und Agavin-Typ (verzweigte Neo-Fruktane; Lopez *et al.* 2003) unterteilt. Neo-Fruktane (Neo-Inulin & Neo-Levan), weisen neben terminalen Glukose-Einheiten zusätzlich interne Glukose-Reste auf (Ritsema and Smeekens 2003). Fruktane und Fruktooligosaccharide (FOS) werden in die Klasse der Präbiotika eingeordnet, da die Verbindungen selektiv von gesundheitsfördernden Vertretern der intestinalen Mikrobiota verwertet werden (Roberfroid 1993; Flamm *et al.* 2001). Fruktane des Inulin-Typs werden bereits im kommerziellen Maßstab aus Pflanzen wie Chicorée (*Cichorium intybus*) oder Topinambur (*Helianthus tuberosus*) isoliert und als Nahrungsergänzungsmittel in Lebensmitteln und Getränken sowie in Tierfuttermitteln eingesetzt (Huebner *et al.* 2007; Pasephol and Sherkat 2009). Die selektive Fermentation von Inulin und Inulin-FOS durch gesundheitsfördernde Bakterien wurde in zahlreichen Studien untersucht. Es zeigte sich, dass die Fermentierbarkeit und damit die präbiotische Wirkung stark vom Polymerisierungsgrad (Degree of Polymerization; DP) der entsprechenden Inulin-Präparation abhängen (Gibson and Wang 1994; Roberfroid *et al.* 1998; Rossi *et al.* 2005; Van De Wiele *et al.* 2007).

Zahlreiche Faktoren wie Anbau, Erntezeitpunkt und Lagerbedingungen nach der Ernte führen zu einer hohen Variabilität im DP von pflanzlich extrahiertem Inulin (Cabezas et al. 2002; Saengthongpinit and Sajjaanantakul 2005; Li et al. 2015b). Darüber hinaus beeinflusst die Verarbeitung des Pflanzenmaterials nach der Ernte ebenfalls die Kettenlänge der isolierten Fruktane (Mensink et al. 2015). Um ein einheitliches Produktspektrum mit definierten Kettenlängen zu gewährleisten, wurden mikrobielle Prozesse entwickelt, die regulierbar sind und nicht durch abiotische Faktoren beeinflusst werden. Die definierten Bedingungen der Biotechnologie werden bereits für die großtechnische Herstellung von FOS vom Inulin-Typ verwendet, wodurch konstante Produkteigenschaften und Reinheit gewährleistet werden (Nobre et al. 2015). In den letzten Jahren wurden intensive Anstrengungen unternommen, um die Vorteile der biotechnologischer Inulin-FOS Produktion auch auf andere präbiotische Oligosaccharide zu übertragen – wie beispielsweise Levan FOS.

### 1.3 Levan und Levan-FOS

Eine vielversprechende Alternative für den Inulin-dominierten Fruktan-Markt ist Levan. Das  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktan-Polymer wird sowohl durch pflanzliche als auch durch bakterielle Spezies produziert (Srikanth et al. 2015a; Öner et al. 2016), wobei sich bakterielles Levan durch einen extrem hohen Polymerisierungsgrad auszeichnet (Tanaka et al. 1980). Levan und Levan-basierte FOS weisen ausgezeichnete präbiotische Eigenschaften auf, da diese Verbindungen selektiv das Wachstum probiotischer Bakterien fördern, wie in mikrobiellen Systemen (Marx et al. 2000; Porras-Domínguez et al. 2014; Adamberg et al. 2015) und eukaryotischen Modellen (Yamamoto et al. 1999; Jang et al. 2003a; Hamdy et al. 2018) gezeigt wurde. Der hohe Polymerisierungsgrad von mikrobiellem Levan und die damit verbundenen einzigartigen physikochemischen Eigenschaften eröffnen ein großes Anwendungsgebiet für das  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Polymer (Öner et al. 2016). So wurden für Levan mehrere vorteilhafte physiologische Eigenschaften nachgewiesen, darunter antioxidative, antitumorale (Liu et al. 2012; Srikanth et al. 2015b), antibakterielle (Byun et al. 2014) und antivirale (Esawy et al. 2011) Funktionen. Die nachgewiesene anti-korrosive Wirkung ermöglicht außerdem die Anwendung von Levan in Bereichen außerhalb des Ernährungs- oder Pharmasektors (Finkenstadt et al. 2011).

Polymeres Levan lässt sich im Labormaßstab ertragreich durch Vertreter verschiedener mikrobieller Gattungen produzieren (Öner et al. 2016). Kultur-basierte Strategien auf Basis von *Bacillus subtilis* (*natto*) CCT7712 (Dos Santos et al. 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* NK- $\Delta$ LP (Gu et al. 2017) oder *Saccharomyces cerevisiae* (Ko et al. 2019) erzielten Levan-Ausbeuten von über 70 g L<sup>-1</sup> in unter 48 Stunden. Obwohl sich das vielversprechende Fruktan im Labormaßstab unproblematisch produzieren lässt, gestaltet sich ein „Up-Scaling“ der Produktionsstrategien aufgrund von Engpässen im Downstream-Prozess schwierig (Öner et al. 2016). Limitierende Faktoren wie der hohe Kostenaufwand für die Dialyse oder die Ultrafiltration von Multi-Tonnen-Produktionen und technische Probleme bei der Handhabung großer Ethanol-Mengen machen die großtechnische Produktion von Levan

impraktikabel. Methoden wie die Lyophilisation oder die Vakuum-Trocknung, die in experimentellen Größenordnungen für die Trocknung von Levan eingesetzt werden (Han, 1990; Kazak Sarilmiser *et al.*, 2015), können nur bedingt auf industrielle Maßstäbe übertragen werden. Um Levan dennoch für den präbiotischen Markt zugänglich zu machen, bedarf es alternativer Produktionsstrategien, die eine praktikable und effiziente Aufreinigung des Präbiotikums ermöglichen.

Bei Fruktanen, die einen Polymerisierungsgrad von 2 – 8 Fruktose-Einheiten aufweisen, spricht man von Fruktooligosacchariden (Roberfroid *et al.* 2010). Das vergleichsweise geringe Molekulargewicht von FOS ermöglicht es, diese durch industriell kompatible Verfahren wie Nanofiltration (Kuhn *et al.* 2010), Festbett-Säulen-Chromatographie (Kuhn & Filho 2010; Kuhn *et al.* 2014) oder die moderne SMB-Technologie (Nobre *et al.* 2010) aufzureinigen. Nicht nur aus industrieller Sicht besitzen FOS vorteilhafte Eigenschaften. Wie bereits erwähnt, wirkt sich der Polymerisierungsgrad von Fruktan-Präparationen signifikant auf die Verwertbarkeit durch gesundheitsfördernde Probiotika aus. So konnten erste Untersuchungen mit Levan-FOS verifizieren, dass diese das Wachstum von probiotischen Bifidobakterien wesentlich stärker fördern als polymeres Levan (Porrás-Domínguez *et al.* 2014). Die Entwicklung effizienter Produktionsstrategien für Levan-basierte FOS birgt somit sowohl aus industrieller als auch aus medizinischer Sicht großen Nutzen.

## 1.4 Levansucrasen und Endolevanasen

Die Synthese von Levan wird durch Levansucrasen (EC 2.4.1.10) katalysiert, die der Glykosid-Hydrolase Familie 68 zugeordnet werden. Im Zuge der katalytischen Reaktion spalten Levansucrasen die  $\alpha$ 1- $\beta$ 2 glykosidische Bindung des präferierten Substrates Saccharose, was zur temporären Ausbildung eines Enzym-Fruktosyl-Intermediates führt. Die Fruktosyl-Einheit kann nachfolgend auf den nicht-reduzierenden Fruktose-Anteil des Akzeptor-Moleküls Saccharose transferiert werden. Unter Verwendung von Levansucrasen weist die entstehende Bindung zwischen den Fruktosyl-Einheiten einen  $\beta$ -2,6-glykosidischen Charakter auf (Paulis & Barry 1969). Die entstehenden Fruktan-Moleküle können erneut als Fruktosyl-Akzeptor für das Enzym-Fruktosyl-Intermediat dienen, was zu einer fortlaufenden Elongation und der damit verbundenen Polymerbildung führt (Chambert *et al.* 1974). Die Fruktosyl-Einheit kann vom Enzym-Fruktosyl-Intermediat auch auf ein Wasser-Molekül übertragen werden, was zur Freisetzung von freien Fruktose-Einheiten führt. Neben der Übertragung von Fruktose-Einheiten auf Saccharose, FOS oder Levan, die als Transfruktosylierung bezeichnet wird, katalysieren Levansucrasen demnach auch eine hydrolytische Reaktion.

Neben der Synthese von polymerem Levan katalysieren Levansucrasen unter definierten Reaktionsbedingungen auch die Synthese von kurzkettigen FOS. Aufbauend auf dieser Beobachtung wurden mehrere Strategien für die Produktion von Levan-FOS entwickelt, unter anderem durch Levansucrasen der Gattung *Bacillus* (Euzenat *et al.* 1997; Homann *et al.* 2007; Li *et al.* 2015a). Bei der Levansucrase-vermittelten FOS-Synthese wurde jedoch immer eine Akkumulation von hochmolekularem Levan beobachtet, wodurch die Effizienz der Reaktion verringert und das

Downstream-Processing entsprechender Prozesslösungen erschwert wird. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das Produktspektrum verschiedener Levansucrasen aktiv durch gerichtete Mutagenese moduliert (Ozimek et al. 2006a; Ortiz-Soto et al. 2008; He et al. 2018). Die Substitution von Aminosäuren, die im aktiven Zentrum lokalisiert sind, führte allerdings häufig zu einem raschen Aktivitätsverlust oder zu einer Erhöhung der hydrolytischen Aktivität.

Neuere Ansätze zur Hydrolyse des polymeren Levans beinhalten die Verwendung von spezifischen Glykosidasen der Enzymklasse 3.2.1. Studien konnten zeigen, dass hochmolekulares Levan durch die hydrolytische Aktivität spezifischer Levan-hydrolysierender Enzyme zu kurzkettigen Levan-FOS umgesetzt werden kann (Xu et al. 2019). Die entsprechenden Enzyme dieser Enzymklasse sowie deren vorrangigen Reaktionsprodukte sind nachfolgend in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über Levan-hydrolysierende Enzyme und deren primären Hydrolyse-Produkte.

<b>Enzym</b>	<b>Enzymklasse</b>	<b>Produkt</b>	<b>Beispiele</b>
Levanase/ Endolevanase	EC 3.2.1.65	Levan-FOS (DP 2- 10)	(Miasnikov 1997; Porras-Domínguez et al. 2014; Jensen et al. 2016; Mardo et al. 2017)
$\beta$ -(2,6)-Fruktan-6- levanbiohydrolase	EC 3.2.1.64	Levanbiose	(Murakami et al. 1990; Kang et al. 1999; Saito et al. 2000)
Levanfructotransferase	EC 4.2.2.16	Difruuctoseanhydrid IV	(Saito et al. 1997; Song et al. 2000; Cha et al. 2001; Jang et al. 2003b)
Fruktan-Fruktosidasen	EC 3.2.1.80 / EC 3.2.1.154	Fruktose	(Henson & Livingston 1996; Marx et al. 1997; Van Den Ende et al. 2003)

Wie Tabelle 1 verdeutlicht, hydrolysieren die Endolevanasen der Enzymklasse 3.2.1.65 Levan zu kurzkettigen FOS mit einem DP von 2 – 10. Eine Produktionsstrategie, die auf der simultanen Aktivität einer Levansucrase und einer geeigneten Endolevanase basiert, könnte daher für die effiziente Herstellung von FOS vom Levan-Typ ausgehend von Saccharose verwendet werden. Da die Zahl der bis dato identifizierten und charakterisierten Endolevanasen gering ist, wurde solch einer bi-enzymatischen Produktionsstrategie nur vereinzelt Aufmerksamkeit geschenkt. Die wohl prominenteste Arbeit auf diesem Gebiet ist die Publikation „Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB<sub>1</sub>SacB)“ von Porras-Domínguez und Kollegen aus dem Jahr 2017 (Porras-Domínguez et al. 2017). Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um ertragreiche Verfahren für die Produktion Levan-basierter FOS zu entwickeln.



## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Levan-basierte FOS sind eine vielversprechende Alternative für den Inulin-dominierten Fruktan-Markt. Das im Zuge der Levansucrase-vermittelten Produktion von FOS entstehende polymere Levan erschwert jedoch ein ökonomisches Downstream-Processing entsprechender Prozesslösungen und somit eine breite Kommerzialisierung Levan-basierter Produkte. Deswegen bedarf es neuartiger Produktionsstrategien, die hohe Ausbeuten an präbiotischen Levan-FOS ermöglichen und dabei die Problematik der Polymer-assoziierten Viskositätserhöhung umgehen. Aufbauend auf der Beobachtung, dass *G. japonicus* LMG 1417 auf Saccharose-haltigen Agarplatten große Mengen eines EPS bildete (Kosciow, 2017), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der genannte Organismus und weitere Vertreter der Gattung zur Produktion des  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktan-Polymers Levan befähigt sind. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass Mitglieder des Genus *Gluconobacter* in der Lage sind, Levan im extrazellulären Raum zu synthetisieren (Jakob et al. 2012; Jakob et al. 2019). Aufgrund der hohen Osmotoleranz und der charakteristischen Fähigkeit zur unvollständigen Oxidation von Zuckern und Alkoholen, wird *Gluconobacter* bereits für zahlreiche industrielle Applikationen eingesetzt und könnte daher auch für die großtechnische Produktion präbiotischer FOS Anwendung finden (Gupta et al. 2001; Prust et al. 2005).

Um einen effizienten Abbau von polymerem Levan zu ermöglichen und somit die Viskosität entsprechender Reaktionslösungen zu reduzieren, sollten in dieser Arbeit zudem Levan-hydrolysierende Enzyme identifiziert und charakterisiert werden. Basierend auf Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates lag der Fokus dabei auf Enzymen, die ausgehend von Levan kurzkettige FOS mit einem Polymerisierungsgrad von  $\geq 3$  bilden. Die Verordnung legt fest, dass nur Kohlenhydratpolymere, die aus drei oder mehr Monomer-Einheiten bestehen, als Ballaststoffe deklariert werden können. Da für die Gattung *Gluconobacter* zahlreiche genetische Tools existieren, sollten geeignete Endolevanasen heterolog in Levan-bildenden *Gluconobacter* Stämmen produziert werden und *in-vivo* eine Degradierung von polymerem Levan bewirken. Um die entstehenden präbiotischen FOS identifizieren und quantifizieren zu können, war zusätzlich die Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahren für Levan-FOS erforderlich.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), VWR International (Darmstadt, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Hersteller Megazyme (Bray, Irland), TCI (Eschborn, Deutschland) und Carbosynth (Compton, Großbritannien) lieferten spezifische Kohlenhydrate. Reagenzien und Enzyme, die im Zuge von molekularbiologischen Methoden Anwendung fanden, wurden von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

#### 2.1.1 Antibiotika

Zur Vermeidung von Kontaminationen, als Selektionsmarker bei Klonierungen und zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks transformierter Plasmide, wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]
Ampicillin	50 % [v/v] Ethanol	100
Carbenicillin	50 % [v/v] Ethanol	100
Cefoxitin	H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	50
Chloramphenicol	50 % [v/v] Ethanol	10
Kanamycin	H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	50
Tetrazyklin	50 % [v/v] Ethanol	15

#### 2.1.2 Zusätze

Der in Tabelle 3 gelistete Zusatz diente zu Induktion regulierbarer Promotorsysteme unter Verwendung der pASK-Überexpressionsplasmide.

Tabelle 3: Verwendete Kultivierungszusätze

Zusatz	Lösungsmittel	Endkonzentration [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]
Anhydrotetrazyklin	50 % [v/v] Ethanol	0,2

#### 2.1.3 Molekularbiologische Kits

Für eine Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Kits und deren Funktion dient die nachfolgende Tabelle 4. Alle Kits wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Die Durchführung der aufgelisteten Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 4: Verwendete molekularbiologische Kits

<b>Kitname</b>	<b>Verwendung/Funktion</b>
Monarch <sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit	Aufreinigung genomischer DNA
Monarch <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Miniprep-Maßstab
Monarch <sup>®</sup> PCR & DNA Cleanup Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten
NEBuilder <sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Cloning Kit	Assemblierung und Klonierung multipler DNA-Sequenzen zu einem zirkulären Plasmid
Q5 <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Gerichtete Mutagenese von Plasmiden

### 2.1.4 Marker für die Gel-Elektrophorese

Im Zuge der Gel-Elektrophorese von DNA- und Proteinpräparationen dienen die in Tabelle 5 aufgeführten Marker als Größen-Standards.

Tabelle 5: Verwendete Marker

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Quick-Load <sup>®</sup> Purple 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
GeneRuler <sup>™</sup> 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

### 2.1.5 Software und Browser-basierte Tools

Die in Tabelle 6 aufgeführten Programme und Browser-basierten Tools wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Programme

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>
Chromas 2.6.5 <i>Technelysium Pty Ltd</i>	Visualisierung von DNA-Sequenzierungen
Chromquest 5.0 <i>Thermo Fisher Scientific</i>	Steuerung von chromatographischen Systemen von Thermo Fisher Scientific
ClarityChrom 8.2.3 <i>Knauer GmbH</i>	Steuerung von chromatographischen Systemen der Knauer GmbH
Clone Manager 9 Professional Edition <i>Sci Ed Software LLC</i>	Durchführung von <i>in-silico</i> Klonierungen und Erstellung von Plasmidkarten
Clustal Omega <i>The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)</i>	Vergleich von DNA- und Proteinsequenzen
Emboss Needle <i>The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)</i>	Paarweiser Vergleich von DNA- und Proteinsequenzen

Graph-Pad Prism 8.4 <i>Graphpad Software, Inc</i>	Regressionsanalysen im Zuge enzymatischer Charakterisierungen
KEGG <i>Kanehisa Laboratories</i>	Gen- und Genomenzyklopädie
Mendeley Desktop 1.19.4 <i>Mendeley Ltd.</i>	Literaturverwaltungsprogramm
MestReNova <i>Mestrelab Research S.L. .</i>	Auswertung und Visualisierung von NMR-Spektren
Microsoft Office 365 <i>Microsoft Corporation</i>	Erstellen von Texten, Diagrammen und Tabellen
NCBI Blast <i>National Center for Biotechnology Information</i>	Algorithmus und Programm zum Vergleich biologischer Sequenzinformationen
Phobius <i>Stockholm Bioinformatics Center</i>	Analyse von Transmembran-Domänen und Signalpeptiden
Primer D'Signer 1.1 <i>IBA GmbH</i>	Automatische Generierung von <i>BsaI</i> kompatiblen Oligonukleotid-Primern
Protparam <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>	Berechnung physikalischer und chemischer Proteinparameter
SignalP 5.0 <i>Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark</i>	Analyse von Signalpeptiden und Peptidase-Erkennungs-Sequenzen
SnapGene 1.1.3 <i>GSL Biotech LLC</i>	<i>In-silico</i> Planung, Visualisierung und Dokumentation von Klonierungen und PCR-Reaktionen
Spectra Manager II <i>JASCO Deutschland GmbH</i>	Aufnahme und Auswertung von spektrophotometrischen Daten
TatP 1.0 <i>Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark</i>	Analyse von Signalpeptiden des Twin-Arginin-Translokationsapparats und Peptidase-Erkennungs-Sequenzen
TMHMM 2.0 <i>Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark</i>	Identifizierung von Transmembran-Helices
Uniprot <i>European Bioinformatics Institute, Swiss Institute of Bioinformatics &amp; Protein Information Resource</i>	Datenbank für Proteinsequenz- und Annotationsdaten
Veusz 3.2.1 <i>Dr. Jeremy Sanders</i>	Wissenschaftliches Plot-Programm zur Erstellung von Vektor-Grafiken

## 2.2 Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer

### 2.2.1 Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Organismen verwendet. Bezugsquellen der genannten Organismen waren New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland), die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Deutschland) und die BCCM/LMG Stammsammlung (Gent, Belgien).

Tabelle 7: Verwendete Mikroorganismus und dazugehöriger Genotyp.

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> NEB® 5-alpha	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> BW 25113	<i>lacI<sup>q</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub></i>	(Datsenko & Wanner 2000)
<i>Gluconobacter japonicus</i> LMG 1417	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Li et al. 2017)
<i>Gluconobacter cerinus</i> LMG 1425	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Katsura et al. 2002)
<i>Gluconobacter oxydans</i> LMG 1385	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Mason & Claus 1989)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Mason & Claus 1989)
<i>Gluconobacter</i> sp. DSM 3504	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Motizuki et al. 1966)
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621 H	Wildtyp, Cef <sup>R</sup>	(Mason & Claus 1989)

### 2.2.2 Oligonukleotidprimer

Primer, die für Klonierungen eingesetzt wurden, wurden entweder manuell, mit Hilfe des Primer D'Signers (IBA GmbH) oder durch das NEBuilder Assembly Tool (New England Biolabs) generiert. Klonierungsprimer und Sequenzierungsprimer, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, sind in Tabelle 8 aufgeführt. Neben der Primer-Bezeichnung zeigt die Tabelle zusätzlich die Template-Bereiche mit denen die Primer-Sequenzen in entsprechenden PCR-Reaktionen hybridisieren sollten. Alle verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 8: Verwendete Primer

Bezeichnung	Template	Sequenz	Restriktions schnittstelle
p5_levS1417_for	KXV23964.1	ATTACCGCGGAAAATGCTATTTCCA GCCGAA	<i>SacII</i>
p5_levS1417_rev	KXV23964.1	ATTACTCGAGTCAGGCACGAACGTC ATAGG	<i>XhoI</i>
levS1417_EcoRV_for	KXV23964.1	ATTAGATATCAGGAGGAAAAAAAAA TGAATGCTATTTCCAGC	<i>EcoRV</i>
levS1417_AscI_rev	KXV23964.1	ATTAGGCGCGCCTCAGGCACGAACG TCATA	<i>AscI</i>
levB_LMG1417_oSP_f	KXV26505.1	ATTACCGCGGCTGAAGAGACGCCTG TA	<i>SacII</i>
levB_LMG1417_oSP_r	KXV26505.1	ATTAAAGCTTCTACATCGCCGTAGG GCG	<i>HindIII</i>
LevB <sub>1</sub> _pASK5_for	AAU42527.1	ATGGTAGGTCTCAGCGCCCCGGGAAA CAGAAAAAAAAAGGGAGAA	<i>BsaI</i>
LevB <sub>1</sub> _pASK5_rev	AAU42527.1	ATGGTAGGTCTCATATCAATCGCGG ATTGAACGCAAATGTTT	<i>BsaI</i>
LevB <sub>2286</sub> _pASK5_for	TCL34862.1	ATGGTAGGTCTCAGCGCCCCGCTC CGGCGACCCCCG	<i>BsaI</i>
LevB <sub>2286</sub> _pASK5_rev	TCL34862.1	ATGGTAGGTCTCATATCAGTCTGCG GGCGCCGCTGGC	<i>BsaI</i>
BT <sub>1760</sub> _pASK5_for	AAO76867.1	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGACGAGA CTGACCCCATCTTGA	<i>BsaI</i>
BT <sub>1760</sub> _pASK5_rev	AAO76867.1	ATGGTAGGTCTCATATCAATAAGTG CTTACCTGAACGTCTGA	<i>BsaI</i>
LevS/LevB- Assembly_for	pASK5_levS1417	GACCCGACACCATCGAATGGATTAA TTCCATAATTTTTGTTGACACTC	-
LevS/LevB- Assembly_rev	pASK5_levS1417	ATTAGGAATTAATCATCTGGAGATC CGTGACGCAGTAG	-
pASK5_optRBS_for	pASK-IBA Vektoren	AAAAAAAAATGGCTAGCTGGAGCCAC	-
pASK5_optRBS_rev	pASK-IBA Vektoren	TCCTCCTTCTAGATTTTTGTGCGAAC TATTCATTTTAC	-
pASK_for	pASK-IBA Vektoren	GAGTTATTTTACCACTCCCT	-
pASK_rev	pASK-IBA Vektoren	CGCAGTAGCGGTAAACG	-
pX2_Cas9_screen_f	pX2_Cas9	TTTGGGCTAGCACCGCCTAT	-
pX2_Cas9_screen_r	pX2_Cas9	AAATAGCATGCAGCTCACCC	-
pSIM5_screen_f	pSIM5	TGTTCTGGTCGGCGCATAGC	-
pSIM5_screen_r	pSIM5	CGTCACCTTCATGGTGGTC	-
pSS9_screen_f	pSS9-Derivate	TTTTCTACGGGGTCTGACGC	-

pSS9_screen_rev	pSS9-Derivate	TTAGACGTCAGGTGGCACTT	-
SS9_genomic_for	SS9-Lokus im Genom von <i>E. coli</i> BW25113	CGTCCAGCAAGAAAACAACC	-
SS9_genomic_rev	SS9-Lokus im Genom von <i>E. coli</i> BW25113	TGCGTCATTCCGGAGTTTAT	-
SS9_RNA_Screen_f	SS9_RNA	AATAGGCGTATCACGAGGC	-
SS9_RNA_Screen_r	SS9_RNA	GATTTAATCTGTATCAGG	-

### 2.2.3 Vektoren und Plasmide

Die für die Produktion rekombinanter Proteine generierten Plasmide sowie die dafür genutzten Ausgangsvektoren sind nachfolgend in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Vektoren/Plasmide mit Funktionsbeschreibung.

Bezeichnung	Funktion	Referenz
pASK-IBA5	Vektor mit induzierbarem Tetrazyklin Promotor/Operator für die regulierte Expression rekombinanter Proteine; ermöglicht eine C-terminale Fusion mit dem Strep-Tag II, Amp <sup>R</sup> -Kassette	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)
pASK5_levS1417	Derivat von pASK-IBA5, welches das Gen <i>levS1417</i> (GenBank: KXV23964.1) aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 trägt	Diese Arbeit
pBBR1-p264-streplong	Derivat von pBBR1MCS-2; trägt die 5'-UTR des Gens <i>gox0265</i> und einen Teil des pASK-IBA3-Plasmids, das die Strep-tag II-kodierende Sequenz und eine Transkriptionsterminations-sequenz enthält; Kan <sup>R</sup>	(Zeiser et al. 2014)
pBBR1_p264_levS1417	Derivat von pBBR1-p264-streplong, welches das Gen <i>levS1417</i> aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417; Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pASK5_levB2286	Derivat von pASK-IBA5, welches eine trunkierte Sequenz des Gens <i>levB2286</i> (GenBank: TCL34862.1) aus <i>A. chroococcum</i> DSM 2286 trägt	Diese Arbeit
pASK5_levB_Blic	Derivat von pASK-IBA5, welches eine trunkierte Sequenz des Gens <i>levB<sub>1</sub></i> (GenBank: AAU42527.1) aus <i>B. licheniformis</i> DSM 13 trägt	Diese Arbeit
pASK5_bt1760	Derivat von pASK-IBA5, welches eine trunkierte Sequenz des Gens <i>bt1760</i> (GenBank: AAO76867.1) aus <i>B. thetaiotaomicron</i> DSM 2079 trägt	Diese Arbeit

pASK5_levS1417_levB2286	Derivat von pASK-IBA5 welches das Gen <i>levS1417</i> (GenBank: KXV23964.1) aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 und eine trunkierte Sequenz des Gens <i>levB2286</i> (GenBank: TCL34862.1) aus <i>A. chroococcum</i> DSM 2286 trägt	Diese Arbeit
pASK5_optRBS_levS1417	Derivat von pASK-IBA5 mit optimierter Ribosomenbindestelle, welches das Gen <i>levS1417</i> (GenBank: KXV23964.1) aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 trägt	Diese Arbeit
pASK5_optRBS_levB2286	Derivat von pASK-IBA5 mit optimierter Ribosomenbindestelle, welches eine trunkierte Sequenz des Gens <i>levB2286</i> (GenBank: TCL34862.1) aus <i>A. chroococcum</i> DSM 2286 trägt	Diese Arbeit
pX2_Cas9	Derivat von pBTBX-2 mit induzierbarem araBAD-Promotor für die regulierte Expression der Endonuklease <i>Cas9</i> aus <i>Streptococcus pyogenes</i> SF370; Kan <sup>R</sup> -Kassette	(Bassalo et al. 2016)
pSIM5	Plasmide zur Expression der lambda Red Proteine unter Kontrolle des nativen $\lambda$ Phagen <i>pL</i> -Promotors, welcher durch den Hitze-sensitiven <i>ci857</i> Repressor reguliert wird; Cm <sup>R</sup> -Kassette	(Datta et al. 2006)
SS9_RNA	Derivat von pUC19, welches konstitutiv die gRNA exprimiert, die CRISPR-vermittelt einen Doppelstrangbruch am SS9-Lokus im Genom von <i>E. coli</i> BW 25113 induziert; Car <sup>R</sup> -Kassette	(Qi et al. 2013)
pSS9	Derivat von pBR322, welches Homologie-Arme zum SS9-Lokus im Genom von <i>E. coli</i> BW 25113 und das für GFP kodierende Gen unter dem Einfluss des starken konstitutiven Promotors T7A1-Promotors trägt; Tet <sup>R</sup> -Kassette	(Bassalo et al. 2016)
pSS9_optRBS_levS1417	Derivat von pSS9, welches anstelle des GFP Gens die kodierende Sequenz der Levansucrase aus <i>G. japonicus</i> LMG 1417 sowie eine optimierten RBS und Spacer-Region trägt; Tet <sup>R</sup> -Kassette	Diese Arbeit



## 2.3 Mikrobiologische Methoden

Zur Sterilisation wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Medien für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Antibiotika und Medienkomponenten, die nicht für den Autoklavierungsprozess geeignet waren, wurden unter Verwendung von sterilen 0,22 µm PES-Filtern sterilfiltriert und den Medien nachträglich zugefügt. Für die Herstellung von Agar-Platten wurden entsprechende Medien vor dem Autoklavieren 1,5 %-ig [w/v] mit Agar-Agar, Kobe I versetzt.

### 2.3.1 Kultivierung von Vertretern der Gattung *Gluconobacter*

Vertreter der Gattung *Gluconobacter* wurden aerob in dem von der BCCM/LMG (Gent, Belgium) ausgeschriebenem Medium Nr. 13 kultiviert, dessen Zusammensetzung in Tabelle 10 dargestellt ist.

Tabelle 10: Zusammensetzung des für die Kultivierung von *Gluconobacter* Stämmen verwendeten Mediums Nr. 13.

<b>Medium Nr. 13</b>	
D-Mannitol	25 g
Hefeextrakt	5 g
Pepton	3 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 ml

Die Kultivierung erfolgte in Schikanekolben bei 28 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde allen *Gluconobacter* Kulturen Cefoxitin zugesetzt. Abhängig vom experimentellen Ansatz wurde die Zusammensetzung des Mediums Nr. 13 variiert. Für die Produktion von Levan und Levan-basierten Fruktooligosacchariden wurden dem Medium verschiedene Mengen Saccharose supplementiert. Die Mannitol-Menge wurde entsprechend reduziert, jedoch nie unter eine Endkonzentration von 5 mM, um die vorteilhaften Eigenschaften von Mannitol als kompatibles Solut zu nutzen (Zahid et al. 2015). Zur Pufferung des pH-Werts wurde MES-Puffer pH 6,9 in einer Endkonzentration von 100 mM verwendet.

### 2.3.2 Fermentation von *Gluconobacter japonicus* LMG 1417 und *Gluconobacter japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417

Die Fermentation des Wildtyps *Gluconobacter* (*G.*) *japonicus* LMG 1417 und des generierten Überexpressionsstammes *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 erfolgte in einem DASGIP® Bioreaktorsystem (Jülich, Deutschland) bei automatisierter pH-Titration und Druckgesteuerter Sauerstoff-Zufuhr in einem Volumen von 600 ml. Das mittels Heizmanschette auf 30 °C temperierte Glas-Gefäß wurde durch einen Druckluft-Fluss von 40 L/min mit Raumluft belüftet. Um eine Kontamination der Fermentationsansätze zu vermeiden, passierte die Luft vor dem Bioreaktorsystem einen Sterilfilter. In Kombination mit einem externen Magnetrührer sorgte ein im Reaktor befindlicher Rührfisch bei einer Umdrehung von 600 rpm für eine homogene Verteilung der zugeführten Druckluft.

Durch entsprechende Sonden wurde die Temperatur sowie der pH-Wert der Kulturen kontinuierlich detektiert und automatisch angepasst. Die automatisierte pH-Steuerung der Fermenter aktivierte eine externe Peristaltik-Einheit, sobald der pH-Wert der Fermentationen unter 5,1 sank und sorgte unter Verwendung einer sterilen, 1M NaOH-Lösung für ein gleichbleibendes pH-Niveau. Das Fermentationsmedium basierte auf dem Medium Nr.13, dem 1,2 M Saccharose und 5 mM Mannitol supplementiert wurde. Für eine initiale Pufferung der Kulturen wurde steriler MES-Puffer (pH 6,9) in einer Endkonzentration von 100 mM zugefügt. Die Inokulation der Fermenter erfolgte durch Zugabe entsprechender Übernachtskulturen der oben beschriebenen Stämme bis zu einer Start-OD<sub>600nm</sub> von 0,1. Durch Septen am Bioreaktor erfolgte eine diskontinuierliche Beprobung der Fermentationen zur Bestimmung der optischen Dichte sowie zur chromatographischen Analyse des Kulturüberstandes. Verfolgt wurde dabei die Konzentration des Substrates Saccharose unter Verwendung der Aminex HPX-87H (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland). Nach 43 Stunden wurde den Fermentationen des Überexpressionsstammes *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 ein Saccharose-Feed in Form von kristalliner Saccharose zugeführt. Dafür wurden 75 g Saccharose für 30 Minuten bei 90 °C sterilisiert und über einen seitlichen Zugang des Bioreaktors in die Fermenter eingeleitet. Das Experiment wurde als biologisches Duplikat durchgeführt.

### **2.3.3 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* pBBR1\_p264\_levS1417**

Die zellfreie Levanproduktion wurde mit dem Kulturüberstand der Stämme *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* pBBR1\_p264\_levS1417 durchgeführt. Die Stämme wurden zunächst bei 28 °C und 180 rpm in einer modifizierten Version von Medium Nr. 13, das 50 mM Saccharose und 5 mM Mannitol enthielt, bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 2 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 20.000xg und 20 °C für 25 Minuten abgetrennt. Für die zellfreie Levan-Produktion wurden 7,8 ml einer 2,3 M Saccharose-Lösung mit 200 µl eines 1 M Acetat-Puffers auf pH 5 eingestellt. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 ml Kulturüberstand initiiert, bei 28 °C inkubiert und mittels HPLC quantitativ verfolgt. Levan wurde aus periodisch entnommenen Proben durch Zugabe von vier Volumina 96 % [v/v] eiskaltem Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation (13.000xg, 1 min, 20 °C) pelletiert. Vor der HPLC-Analyse wurde das Präzipitat einer sauren Hydrolyse nach der Methode von Nguyen et al. unterzogen (Nguyen et al. 2009). Um das Molekulargewicht des ausgefallenen EPS zu bestimmen, wurde ein Teil des Präzipitats mittels asymmetrischer Flussfeld-Fluss-Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkel-Laserlichtstreuung und UV-Detektion analysiert. Das Experiment wurde in dreifacher Ausführung mit dem Überstand verschiedener Kulturen durchgeführt.

### **2.3.4 Kultivierung von *Escherichia coli***

*Escherichia (E.) coli* diente in dieser Arbeit als Klonierungsplattform und als Produktionsorganismus für rekombinante Proteine. Zwecks heterologer Produktion wurde *E. coli* aerob in Lysogeny-Broth-

(LB)-Medium in der Miller-Formulierung kultiviert. Die Komponenten des Mediums sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 180 rpm in Schikanekolben.

Tabelle 11: Zusammensetzung des für die Kultivierung von *E. coli* verwendeten LB-Miller Mediums.

<b>LB-Miller Medium</b>	
Hefeextrakt	5 g
Typton	10 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 ml

### 2.3.5 Stammhaltung von Mikroorganismen

Die kurzfristige Lagerung von Mikroorganismen erfolgte in Form von Flüssigkulturen oder auf Agarplatten bei 4 °C. Für eine langfristige Lagerung wurden die in dieser Arbeit erstellten Stämme in Form von Kryo-Stocks bei -70 °C eingefroren. Dazu wurden 800 µl einer flüssigen Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerin ROTIPURAN® versetzt und bei -70 °C in geeigneten Kryo-Gefäßen eingestockt.

### 2.3.6 Bestimmung von mikrobiellen Wachstumsparametern

#### 2.3.6.1 Bestimmung der optischen Dichte

Das Wachstum bakterieller Suspensionskulturen kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) basiert auf dem Phänomen der Lichtstreuung und ermöglicht bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 einen verlässlichen Nachweis des relativen Zellgehalts einer zu messenden Bakterien-Suspension. Um eine durch Mehrfachstreuung hervorgerufene, fälschliche Absenkung der Extinktion zu verhindern, wurden Kulturen ab einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 mit Medium verdünnt. Die OD-Bestimmung erfolgte in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Für die Messungen wurden die Küvetten mit einem ml einer entsprechenden bakteriellen Kultur versetzt.

#### 2.3.6.2 Bestimmung der Wachstumsrate $\mu$ und der Verdopplungszeit $t_d$

Durch die regelmäßige Beprobung bakterieller Kulturen kann deren Wachstum in Form einer Wachstumskurve dargestellt werden. Eine logarithmische Auftragung der gemessenen Extinktionswerte bei 600 nm ermöglicht die Bestimmung der Wachstumsrate  $\mu$  sowie der Verdopplungszeit  $t_d$ . Die für die Berechnung zugrundeliegenden Formeln sind nachfolgend dargestellt.

Formel 1: Bestimmung der Wachstumsrate  $\mu$ . Der Wert  $N_0$  bezieht sich auf den Anfang des Messintervalls, der Wert  $N_t$  auf das Ende des Messintervalls. Die Differenz aus  $t$  und  $t_0$  beschreibt die zeitliche Länge des Messintervalls.

$$\text{Wachstumsrate } [\mu] = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{(t - t_0)}$$

Formel 2: Bestimmung der Verdopplungszeit  $t_d$ .

$$\text{Verdopplungszeit [td]} = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

Alle nachfolgend aufgeführten molekularbiologischen Kits wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte durch das Monarch<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) unter Verwendung von 2 ml Kulturvolumen einer entsprechenden Übernachtskultur (37 °C / 180 rpm) von *E. coli*.

### 2.4.2 Isolierung von genomischer DNA

Für die Aufreinigung der genomischen DNA aus *G. japonicus* LMG 1417, *Azotobacter (A.) chroococcum* DSM 2286 und *Bacillus (B.) licheniformis* DSM 13 wurde das Monarch<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Jeweils 2 ml Kulturvolumen wurden für die Präparation der Genom-DNA eingesetzt.

### 2.4.3 Photometrische Quantifizierung von DNA

Für die photometrische Quantifizierung von DNA wurde das Eppendorf BioPhotometer<sup>®</sup> D30 in Kombination mit der Eppendorf  $\mu$ Cuvette<sup>®</sup> G1.0 genutzt. Dafür wurden 3  $\mu$ l der zu messenden DNA-Präparation auf die Küvette gegeben und die Absorption der Lösung bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Zur Messung eines Leerwerts wurde eine analoge Messung unter Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>f</sub> durchgeführt. Das verwendete Photometer ermöglichte eine Reinheits-Bestimmung der gemessenen Lösung, indem gleichzeitig zur  $A_{260}$  auch die Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) ermittelt wurde, bei der spezifisch Proteine detektiert werden.

### 2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerasekettenreaktion kann eine *in-vitro*-Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente erzielt werden (Mullis & Faloona 1987). Als Template für diesen Vorgang kann sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA dienen. Für die selektive Amplifizierung eines spezifischen Genbereichs bedient man sich zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer, die den zu vervielfältigenden Abschnitt flankieren und nach Ablauf einer Hitzedenaturierung mit komplementären Bereichen der einzelsträngigen DNA hybridisieren. Ausgehend von den freien 3'-OH-Enden dieser Primer erfolgt anschließend die Komplementierung der Einzelstrang-DNA, ein Vorgang, der von DNA-Polymerasen durchgeführt wird. Durch die zyklische Wiederholung dieses Prozesses kann eine exponentielle Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente erzielt werden. Grundlage für den zyklischen Ablauf ist die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen im verwendeten PCR-Ansatz (Saiki et al. 1988). Diese

überstehen die hohen Temperaturen, die zur Denaturierung der DNA nötig sind, unbeschadet und müssen so dem Ansatz nicht erneut beigeführt werden.

Bei der Polymerasekettenreaktion hat die Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der verwendeten Oligonukleotid-Primer eine hohe Bedeutung für einen erfolgreichen Ablauf und die Spezifität der Amplifizierung. Für die in dieser Arbeit für routinemäßige Screenings verwendete *OneTaq*<sup>®</sup>-Polymerase, empfiehlt der Hersteller eine Annealingtemperatur ( $T_A$ ), die etwa 2 – 5 °C unter der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen liegt.

Vorrangiges Anwendungsgebiet der *OneTaq* Polymerase war die Kolonie-PCR, bei der im Anschluss an die Transformation konstruierter Plasmiden, positive Transformaten verifiziert wurden. Für die Kolonie-PCR wurde Zellmaterial von auf Selektivplatten gewachsenen Einzelkolonien steril in 5 µl fassende H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>-Aliquots und dazugehörige 100 µl LB-Backups überführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung eines *OneTaq* PCR-Reaktionsansatzes.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [µl]</b>
<i>OneTaq</i> Quick-Load 2X Master Mix mit Standard Puffer	12,5
10 µM Vorwärtsprimer	0,5
10 µM Rückwärtsprimer	0,5
Template DNA	Variabel
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 25

Die mit Zellmaterial versetzten H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>-Aliquots wurden mit den in Tabelle 12 aufgeführten Reaktions-Komponenten komplementiert und dem nachfolgend in Tabelle 13 beschriebenen PCR-Programm unterzogen.

Tabelle 13: PCR-Programm für *OneTaq*-basierte PCR-Reaktionen.

<b>PCR-Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [sec]</b>	
Initiale Denaturierung	94	60	
Denaturierung	94	20	} 30 Zyklen
Annealing	$T_A$	30	
Elongation	68	60 / kb	
Finale Elongation	68	120	
Lagerung	12	∞	

Nach erfolgreicher Amplifizierung eines ausgewählten Gen-Bereichs wurden die LB-Backups für die Inokulation von Übernachtskulturen eingesetzt.

Die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland) zeichnet sich durch eine extrem hohe Genauigkeit und Syntheserate aus. Durch die Fusionierung mit einer Sso7d-Domäne, die sich positiv auf die Prozessivität der Polymerase auswirkt, eignet sich die Q5-Polymerase besonders für Klonierungen. Die Zusammensetzung eines entsprechenden Reaktionsansatzes ist in Tabelle 14 abgebildet.

Tabelle 14: Zusammensetzung eines Q5 PCR-Reaktionsansatzes.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [µl]</b>
5X Q5 Reaction Buffer	10
10 mM dNTPs	1
10 µM Vorwärtsprimer	2,5
10 µM Rückwärtsprimer	2,5
Template DNA	1
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	0,25
5X Q5 High GC Enhancer (optional)	10
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 50

Herstellerseits wird unter Verwendung der Q5 Polymerase eine Annealing-Temperatur empfohlen, die 3 °C über der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen liegt. In dieser Arbeit wurden die Annealing-Temperaturen (T<sub>A</sub>) der durchgeführten PCR-Ansätze *in-silico* mit Hilfe der Software SnapGene ermittelt und in das in Tabelle 15 dargestellte PCR-Programm integriert.

Tabelle 15: PCR-Programm für Q5-basierte PCR-Reaktionen

<b>PCR-Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [sec]</b>	
Initiale Denaturierung	98	30	
Denaturierung	98	10	} 30 Zyklen
Annealing	T <sub>A</sub>	20	
Elongation	72	20 / kb	
Finale Elongation	72	120	
Lagerung	12	∞	

## 2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Für eine Visualisierung und damit verbundene Evaluierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente, wurde sich in dieser Arbeit der Methodik der Agarose-Gelelektrophorese bedient. Diese ermöglicht durch einen Vergleich mit definierten Nukleinsäure-Standards die Größenbestimmung von linearer, doppelsträngiger DNA (Sambrook et al. 1989). Grundlage für diesen Vergleich ist die Auftrennung von DNA in einem engmaschigen Agarose-Polymer-Gel. Durch das Anlegen eines

elektrischen Feldes wandern negativ geladene DNA-Moleküle in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Größe des aufzutrennenden Fragmentes. Neben der Größe der DNA-Moleküle wird das Laufverhalten zusätzlich von der Porengröße des verwendeten Agarosegels beeinflusst.

Für die Verwendung des horizontalen Gelelektrophorese-Systems „Horizon® 58“ der Firma Whatman Inc. (Little Chalfont, Großbritannien) wurde Agarose in NEEO Ultra-Qualität 1 %-ig [w/v] in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,5) aufgekocht. Vor dem Gießen der Gele erfolgte die Zugabe von einem µl ROTI® GelStain Red (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland). Der interkalierende DNA-Farbstoff zeigt unter UV-Bestrahlung eine Fluoreszenz, deren Intensität sich bei Bindung mit DNA deutlich verstärkt und somit die Detektion amplifizierter Nukleinsäuren ermöglicht.

Amplifikate, die mit Hilfe des in Tabelle 12 aufgeführten Reaktionsansatzes generiert wurden, konnten aufgrund des im *OneTaq* Mastermix enthaltenen Ladepuffers direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt werden. Die im Zuge von Klonierungen durch die Q5-Polymerase erzeugten DNA-Fragmente wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit dem 6X Ladepuffer Purple (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V für eine Stunde. Als Größenstandard dienten die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) oder die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland).

## 2.4.6 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.4.6.1 Restriktionsverdau

Für die gezielte Klonierung von Plasmiden bedient sich die Molekularbiologie einer Vielzahl von Restriktionsendonukleasen, die palindromische Sequenzen innerhalb doppelsträngiger DNA erkennen und durch spezifisches Aufbrechen der Phosphodiesterbrücken einen Doppelstrangbruch herbeiführen können. In Folge dieses Verdauens entstehen dabei entweder glatte ('blunt') oder kohäsive ('sticky') Enden. DNA-Fragmente, die synthetisiert oder mittels PCR ausgehend von geeigneter Template DNA amplifiziert wurden, können nach korrektem Verdau mit den komplementären Enden verdauter Plasmid-DNA hybridisieren. Die optimalen Bedingungen für die durchgeführten Restriktionsansätze wurden mit Hilfe der Online-Tools „DoubleDigest Calculator“ (Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland) und „NEBcloner“ (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) bestimmt. Um eine unerwünschte Religation des Vektorrückgrats zu vermeiden, wurde den Vektor-Restriktionsansätzen 10 Minuten vor Ablauf der Inkubation 1 µl der Quick CIP (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) zugesetzt. Diese ermöglicht eine rapide Dephosphorylierung der 5'-Enden, wodurch die dephosphorylierten Vektor-Fragmente nur mit den gewünschten Insert-Fragmenten ligieren können. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und zur Aufreinigung der verdauten DNA-Fragmente wurden die Restriktionsansätze nach Abschluss der Inkubation mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (siehe Tabelle 4) aufbereitet.

### 2.4.6.2 Ligation

Bei der Klonierung von Plasmiden wird zunächst ein zu inserierendes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert, welches dann durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen verdaut wird, sodass es in einer anschließenden Ligation mit einem komplementär verdauten Vektorgerüst verknüpft werden kann. Die Verknüpfung der komplementären Enden wird dabei durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert, welche unter ATP-Verbrauch die freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektorrückgrats mit den 5'-Phosphatenden des verdauten DNA-Inserts ligiert. In dieser Arbeit wurde für die Ligation von ‚sticky-end‘-Fragmenten der ‚Instant Sticky-end Ligase Master Mix‘ von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Der in Tabelle 16 dargestellte Reaktionsansatz benötigt keine Inkubationszeit und kann nach dem Durchmischen der Komponenten direkt für die Transformation eingesetzt werden. Grundvoraussetzung ist jedoch das Vorhandensein von Sticky Ends bei den für die Ligation eingesetzten DNA-Fragmenten.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes unter Verwendung des Instant Sticky-end Ligase Master Mix.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [µl]</b>
Insert DNA (verdaut & aufgereinigt)	2
Vektor DNA (verdaut & aufgereinigt)	0,5
Instant Sticky-end Ligase Master Mix	2,5

Für ‚blunt-end‘-Ligationen wurde der in Tabelle 17 beschriebene Ligationsansatz unter Verwendung der T4 DNA-Ligase von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Entsprechende Ligationen wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle 17: Zusammensetzung einer Ligationsansatzes unter Verwendung der T4 DNA-Ligase.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [µl]</b>
Insert DNA (verdaut & aufgereinigt)	12
Vektor DNA (verdaut & aufgereinigt)	4
PEG 4000	1
10X T4 DNA-Ligase Puffer	2
T4 DNA-Ligase (5 U µl <sup>-1</sup> )	1

### 2.4.6.3 Gezielte Mutagenese von DNA

Bei der ortsspezifischen Mutagenese von DNA unterscheidet man zwischen der Insertion, Deletion und Substitution von einzelnen oder mehreren Nukleinbasen. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Q5 Site-directed Mutagenesis-Kit (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) regulatorische Plasmid-Elemente wie Ribosomenbindestellen oder Spacerregionen gerichtet modifiziert, um gesteigerte Ausbeuten an



rekombinanten Proteinen zu erzielen. Durch das Online-Tool NEBaseChanger von NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) wurden dafür definierte Primerpaare für eine ‚Overlap extension PCR‘ generiert. Die Primer wurden dabei so konstruiert, dass diese durch Back-to-Back-Annealing eine Amplifizierung des gesamten Template-Plasmids gewährleisten.

Tabelle 18: Zusammensetzung einer KLD-Reaktion zur Rezirkulation modifizierter DNA-Fragmente.

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O <sub>r</sub>	1,5
PCR-Amplifikat	0,5
2X KLD Reaction Buffer	2,5
10X KLD Enzym Mix	0,5

Durch die in Tabelle 18 dargestellte Reaktion wurden die Amplifikate unter Verwendung des KLD Enzym Mix (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) rezirkuliert. Die Rezirkulation erfolgte durch eine Kinase-katalysierte (KLD) Phosphorylierung der 5‘-Überhänge, die die mutagenisierten Nukleinbasen enthielten, und eine anschließende Ligase-vermittelte (KLD) Ligation der phosphorylierten Enden. Durch die im KLD Enzym Mix enthaltene Restriktionsendonuklease *DpnI* (KLD) wurde die methylierte Template-DNA verdaut, sodass in einer anschließenden Transformation nur die gewünschten KLD-Ligationsprodukte von kompetenten Zellen aufgenommen werden konnten. Die KLD-Reaktionen wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss umgehend für die Transformation eingesetzt.

#### 2.4.6.4 Klonierung mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly

Diverse Klonierungsstrategien, wie die in den Kapiteln 2.4.6.1 und 2.4.6.2 beschriebene Ligations-abhängige Klonierung, konnten sich in der Molekularbiologie für die Konstruktion von Plasmiden etablieren. Eine äußerst flexible und zeitsparende Methodik ist in diesem Zusammenhang das ‚Seamless Cloning‘, auch ‚Gene Assembly‘ genannt, auf der das NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit basiert. Merkmal dieses Kits ist die Fusionierung multipler DNA-Fragmente zu einem zirkulären Plasmid, unabhängig von der Fragmentlänge oder der Endkompatibilität. Dieses Verfahren ermöglicht eine Assemblierung von zu 20 kb großen Fragmenten in unter einer Stunde.

In dieser Arbeit wurde das besagte Kit verwendet um Plasmide zu konstruieren, die sowohl die für die Levansucrase LevS1417 kodierende DNA als auch das Gen für die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> enthielten.

Zwecks Gen-Assemblierung erfolgt zunächst die Amplifizierung der Levansucrase codierenden Nukleotidsequenz sowie der flankierenden regulatorischen Elemente des Vektors pASK5\_levS1417. Die dafür verwendeten Primer LevS/LevB-Assembly\_for und LevS/LevB-Assembly\_rev wurden mit Hilfe des NEBuilder® Assembly Tools erstellt. Parallel dazu erfolgte der enzymatische Verdau des Plasmids pASK5\_levB2286 durch die Endonuklease *MscI*. Die durch die Klonierungsstrategie

erzeugten komplementären Überhänge der beiden linearisierten Fragmente wurden dann durch den in Tabelle 19 gezeigten Reaktionsansatz zu einem Plasmid verbunden.

Tabelle 19: Zusammensetzung einer Assemblierungsreaktion unter Verwendung des NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mixes. Empfohlen wurde eine Vektor-Insert Verhältnis von 1:2.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [µl]</b>
DNA-Fragmente	X µl (0.03 – 0.2 pmols)
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>r</sub>	5 – X µl

In der Reaktion, die für 15 min bei 50 °C inkubiert wurde, erzeugte eine Exonuklease einzelsträngige 3'-Überhänge, die mit komplementären Bereichen der an der Assemblierung beteiligten Amplifikate hybridisieren. Die auf den Einzelsträngen vorliegenden Lücken wurden durch eine neuartige proof-reading Polymerase aufgefüllt, sodass die übrig bleibenden Nicks Ligase-vermittelt geschlossen werden konnten. Das Kit generierte somit, je nach Reaktionsansatz, in unter 15 Minuten assemblierte und transformierbare DNA-Konstrukte. Die assemblierte DNA wurde im Anschluss direkt für die Hitzeschocktransformation in *E. coli* eingesetzt.

#### 2.4.7 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung der in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen, wurden klonierte Plasmide aus positiv gescreenten Transformanten präpariert und zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) übermittelt. Dafür wurden 5 µl Template DNA mit 5 µl eines geeigneten Sequenzierungs-Primers (10 pmol µl<sup>-1</sup>) gemischt. Die Auswertung der Sequenzdateien erfolgte mit Chromas 2.6.5 (Technelysium Pty Ltd.) und Emboss Needle (The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)).

#### 2.4.8 Hitzeschock-Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Für eine sichere Lagerung und die Vervielfältigung klonierter Plasmide wurden diese in kompetente *E. coli* NEB5-alpha Zellen (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) transformiert. Durch diverse Modifikationen, wie beispielsweise den Knockout der *endA1*- und *recA1*-Nukleasen, wurde der Genotyp dieser Zellen für eine hohe Plasmid-Stabilität optimiert. Für die Hitzeschock-Transformation wurde ein 50 µl fassendes Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und zeitnah mit jeweils 2 µl der in den Kapiteln 2.4.6.2-2.4.6.4 dieser Arbeit beschriebenen Reaktionsansätzen versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte für 30 Sekunden ein Wasserbad-Hitzeschock bei 42 °C. Im Anschluss wurden die geschockten Zellen erneut für fünf Minuten auf Eis gelagert, mit 950 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C regeneriert. Zur Selektion positiver Transformanten wurden 100 µl der regenerierten Zellen auf entsprechenden LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Neben *E. coli* NEB5-alpha wurde in dieser Arbeit auch der Stamm *E. coli* BL21 mittels

Hitzeschock transformiert. Gemäß der Herstellerangaben wurde bei der Transformation von *E. coli* BL21 die Dauer des Hitzeschocks auf zehn Sekunden verkürzt.

#### 2.4.9 Elektroporation von *Gluconobacter japonicus* LMG 1417

Eine etablierte Methode für die Transformation von Vertretern der Gattung *Gluconobacter* ist die Elektroporation. In dieser Arbeit wurde sich dem von Mostafa *et al.* beschriebenen Elektroporationsprotokoll bedient, um pBBR1-basierte Plasmide in *G. japonicus* LMG 1417 einzubringen (Mostafa *et al.* 2002). Dafür wurden 50 ml des Wildtyp-Stammes in dem in Tabelle 10 aufgeführten Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 – 0,8 kultiviert und anschließend für zehn Minuten bei 3.000 xg und 4 °C abzentrifugiert. Es folgte eine Waschprozedur durch Aufnahme der pelletierten Zellen in 10 ml eiskaltem 1 mM HEPES (pH 7,0), welche zweimal wiederholt wurde. Final wurden die gewaschenen Zellen in 500 µl einer eiskalten, 10 %-igen Glycerin-Lösung aufgenommen und zeitnah für die Elektroporation eingesetzt. Dafür wurden 50 µl der elektrokompetenten Zellen luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt und mit 1 µl Plasmid-DNA (pBBR1\_p264\_levS1417) versetzt. Der Elektropuls erfolgte für 4-5 ms bei einer Pulskontrolle von 200 Ω und einer Spannung von 2,2 kV. Zwecks Regeneration wurden die elektroporierten Zellen mit einem ml des in Tabelle 20 beschriebenen EP-Mediums versetzt, in ein 15-ml Falcon Tube überführt und für zwei Stunden bei 28 °C und 180 rpm inkubiert.

Tabelle 20: Zusammensetzung des zur Regeneration von elektroporierten Zellen verwendeten EP-Mediums.

<b>Elektroporations (EP) – Medium</b>	
Mannitol	80 g
Hefeextrakt	15 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,5 g
Glycerin	0,5 g
CaCl <sub>2</sub>	1,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1000 ml

MgSO<sub>4</sub> und CaCl<sub>2</sub> wurden separat in H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> als 100x-Stocklösungen angesetzt, sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium zugefügt. Im Anschluss an die Regeneration wurden 100 µl der Zellsuspension auf entsprechenden Selektiv-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 28 °C inkubiert.

#### 2.4.10 Genomische Integration in *E. coli* BW 25113

Um eine skalierbare heterologe Produktion der Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> zu etablieren, sollten die für die Proteine kodierenden Gene in das Genom von *E. coli* eingebracht werden. Diese Integration ermöglicht eine stabile Expression entsprechender Gene in Abwesenheit von Antibiotika. Die Verwendung eines konstitutiven Promoters sollte zusätzlich die Zugabe einer Induktor-Verbindung umgehen. Vor allem für Applikationen im Bereich der Lebensmittel-Technologie stellt eine Produktion

auf Basis von Genom-Integrierten einen erheblichen Mehrwert gegenüber Plasmid-basierten Verfahren dar.

In dieser Arbeit wurde das von Bassalo *et al.* entwickelte System zur rapiden Integration heterologer Gene in *E. coli* BW 25113 angewendet (Bassalo et al. 2016). Dieses System nutzt die Fähigkeit des Cas9-Proteins aus *Streptococcus pyogenes*, einen spezifischen Doppelstrangbruch im Genom von Bakterien zu erzeugen (Doudna & Charpentier 2014; Hsu et al. 2014). In Kombination mit dem lambda red-Rekombinase-System kann durch homologe Rekombination an dieser Bruchstelle ein beliebiges Nukleotid-Fragment inseriert werden. Insgesamt vier Plasmide müssen für diesen Vorgang in den zu modifizierenden *E. coli* Stamm eingebracht werden (Abbildung 2).

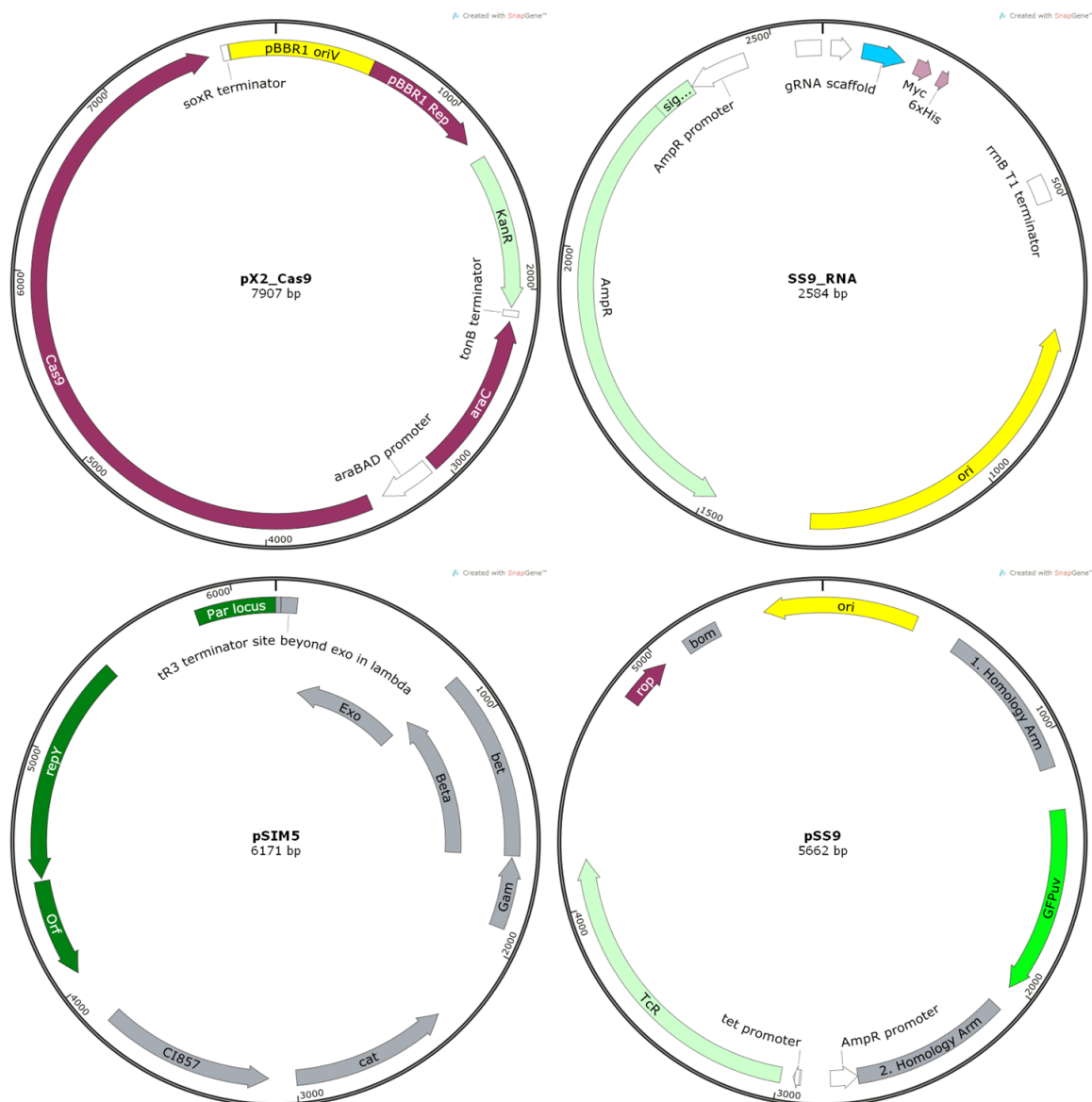


Abbildung 2: Plasmidkarten der vier Konstrukte zur genomischen Integration von GFP in den SS9-Genlocus von *E. coli* BW 25113.

Das erste Plasmid, pX2-Cas9, trägt die für das *Cas9*-Protein kodierende Gensequenz unter dem Einfluss eines Arabinose-induzierbaren Promotor-Systems. Das zweite Plasmid, pSIM5, kodiert unter anderem für das lambda red-Rekombinase System, dessen Expression durch Temperatur-Erhöhung induziert werden kann. Ein drittes Plasmid, SS9\_RNA, trägt die spezifische Guide-RNA (gRNA), die die Endonuklease *Cas9* zum SS9-Locus im Genom von *E. coli* BW 25113 führt. Das vierte und letzte Plasmid, pSS9, trägt die kodierenden Informationen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches stromaufwärts und stromabwärts homologe Arme zu den genomischen Bereichen trägt, die durch den *Cas9* induzierten Doppelstrangbruch im SS9-Lokus generiert werden. Für die Durchführung der genomischen Integration wurden zunächst die Basis-Konstrukte pX2\_CaS9 und pSIM5 mittels Elektroporation in den Stamm *E. coli* BW 25113 eingebracht. Dafür wurde 25 ml LB-Miller Medium 1 %-ig mit einer Vorkultur des entsprechenden Stammes inokuliert und bei 32 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,6 kultiviert. Die Zellen wurden dann mittels Zentrifugation (6000xg, 4 °C, 10 min) abgetrennt. Mit 20 ml eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O wurde das generierte Zellpellet zunächst gewaschen und anschließend in einem ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Suspension wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pelletiert (10.000 rpm, 4 °C, 30 sec) und das entstandene Pellet erneut in einem ml sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Diese Waschprozedur wurde insgesamt drei mal durchgeführt, ehe die Zellen final in 100 µl eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und bis zur Elektroporation auf Eis gelagert wurden. 50 µl der elektrokompetenten Zellsuspension wurde mit jeweils einem µl der zu transformierenden Plasmide versetzt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von einem mm überführt. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA wurden für 4 – 5 ms ein 1,8 kV Stromimpuls bei einem Widerstand von 200 Ω angelegt. Aufgrund des Hitze-sensitiven Promotors des Konstruktes pSIM5 erfolgte die Regeneration der elektroporierten Zellen für 2 h bei 30 °C in LB-Miller Medium mit Kanamycin- und Chloramphenicol-Zusatz. Transformanten wurden nach Über-Nacht-Inkubation der selektiven Nährplatten mittels Kolonie-PCR verifiziert. Ein bestätigter Transformant wurde für die Aufnahme der Plasmide SS9\_RNA und pSS9 in 10 ml LB-Miller-Medium mit Kanamycin-, Chloramphenicol- und 0,2 % [w/v] Arabinose bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 kultiviert. Die supplementierte Arabinose vermittelte in dieser Zeit die Produktion der Endonuklease *Cas9*. Nachfolgend wurde die Kultur für 20 min in einem vorgeheizten Wasserbad bei 42 °C inkubiert, um die Hitze-regulierte Expression der lambda-Red Gene zu induzieren. Nach Abschluss der Hitze-Inkubation wurden die Zellen durch das bereits beschriebene Protokoll für die Elektroporation vorbereitet. Nach Transformation der Plasmide SS9-RNA und pSS9 wurden die elektroporierten Zellen in 1 ml LB-Miller-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 32 °C regeneriert. Zur Selektion von Mutanten, die die genomische Integration durchführen konnten, wurden die regenerierten Zellen über Nacht bei 30 °C auf LB-Platten mit Carbenicillin-Zusatz inkubiert. Transformanten wurden durch Kolony-PCR verifiziert.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

#### 2.5.1.1 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli*

Die heterologe Produktion von Proteinen erfolgte in dieser Arbeit sowohl unter Verwendung von *E. coli* NEB5-alpha als auch durch *E. coli* BL21. Als Expressionsplattform dienten die in Tabelle 9 gelisteten Plasmide auf Basis des pASK-IBA5 Überexpressionsvektors (IBA GmbH; Göttingen, Deutschland).

Für die Produktion rekombinanter Proteine wurden 100 ml LB-Medium 1 %-ig mit einer entsprechenden Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 bei 37 °C und 250 rpm im Schikanekolben kultiviert. Die Induktion erfolgte dann durch Zugabe von 10 µl eines Anhydrotetrazyklin-Stocks (2 mg ml<sup>-1</sup>). Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 16 °C und 180 rpm wurden die Zellen geerntet und für die nachfolgende Proteinaufreinigung eingesetzt.

#### 2.5.1.2 Zellernte und Ultraschall-Aufschluss

Die Produktionskulturen wurden zur Ernte mittels vorgekühlter Zentrifuge für 15 Minuten bei 4 °C und 8.000 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden daraufhin in 10 ml kaltem Puffer W (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert und anschließend durch Ultraschall-Lyse aufgeschlossen. Ein optimaler Aufschluss wurde mit Hilfe des „Cell Disruptors B15“ (Branson Ultrasonics Corporation, Brookfield, USA) erzielt, wenn die Zellen für eine Dauer von 2 min ml<sup>-1</sup> Extraktvolumen einer Output-Intensität von 7 bei einem 50 % Pulsintervall ausgesetzt wurden. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichen Zellbestandteilen wurde das Lysat für 20 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde für die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Proteine eingesetzt.

#### 2.5.1.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine

Durch die *BsaI*-vermittelte Klonierung von kodierenden DNA-Sequenzen in die pASK-IBA Überexpressionsproteine, erfolgt eine Fusionierung mit dem Vektor-kodierten Strep-Tag II (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK). Dies ermöglicht eine affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine. Grundlage für diese Methodik ist die Interaktion des Strep-Tag II mit immobilisierter Strep-Tactin-Sepharose.

In dieser Arbeit diente die Strep-Tactin®XT Superflow® Suspension (IBA GmbH; Göttingen, Deutschland) als Säulenmaterial für die durchgeführten Aufreinigungen. Dafür wurden 5 ml geklärtes Zelllysate auf eine mit Puffer W äquilibrierte Strep-Tactin-Säule mit einem Säulenvolumen (CV) von 0,5 ml gegeben. Nach dem vollständigen Durchfluss des Lysats wurden durch die Zugabe von 6 x 1 CV Puffer W unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution erfolgte in drei Schritten durch die Zugabe von 0,5 CV, 1,5 CV und 0,8 CV BXT-Puffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Biotin, pH 8,0). Zur Regeneration der Säule wurden 6 CV frisch angesetzte NaOH-Lösung (10

mM) über die Säule gegeben, ehe diese final mit 8 CV Puffer W in den äquilibrierten Grundzustand überführt wurde.

Um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden, wurden die Elutionsfraktionen im Anschluss an die Aufreinigung 1 zu 2 mit sterilem Glycerin versetzt und bei -20 °C eingelagert.

### 2.5.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde in dieser Arbeit das auf dem Bradford-Test basierende ROTI<sup>®</sup>-Quant Konzentrat verwendet (Bradford 1976). Dieser Nachweis beruht auf der Verschiebung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm bei Bindung an hydrophobe und kationische Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Zwecks Protein-Quantifizierung wurden 980 µl des verdünnten 5x Konzentrats mit 20 µl der zu messenden Lösung versetzt, der Ansatz durchmischt und für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte eine photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm ( $A_{595}$ ). Durch den Abgleich mit einer Kalibriergeraden, die unter Verwendung von BSA-Lösungen bekannter Konzentration erstellt wurde, konnte der Proteingehalt der gemessenen Lösung ermittelt werden.

### 2.5.3 Auftrennung und Visualisierung von Proteinen

Die von Ulrich K. Laemmli entwickelte Methode der SDS-PAGE ermöglicht eine größenabhängige Auftrennung von Proteinen (Laemmli 1970). Grundlage für diesen Vorgang ist die Bindung des anionischen Tensids SDS an linearisierte und denaturierte Proteine, wodurch diesen eine negative Ladung verlieht wird, die in ihrer Intensität annähernd proportional zum Molekulargewicht ist. Durch die Verwendung eines ungeladenen, polymeren Acrylamid-Gels, bewirkt das Anlegen eines elektrischen Feldes die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe, da kleine Proteine schneller durch die Poren der verwendeten Gel-Matrix wandern als große Proteine. Anhand eines Referenz-Standards mit Proteinen bekannter Größe kann das Molekulargewicht separierter Proteine bestimmt werden. Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele ist in Tabelle 21 abgebildet.

Tabelle 21: Zusammensetzung eines für die SDS-PAGE eingesetzten Polyacrylamid-Gels.

Komponente	Volumen [µl]	
	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese Gel 40 (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland)	250	2000
Trenngelpuffer (1,8 M Tris-HCl, pH 8,8)	-	1200
Sammelgel-Puffer (600 mM Tris-HCl, pH 6,8)	400	-
SDS (0,5 % [w/v])	400	1200
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	950	1600
TEMED (VWR; Darmstadt, Deutschland)	5	5
APS (10 % [w/v])	30	30

Zwecks Probenaufbereitung wurden die aufzutrennenden Proteinfractionen 1 zu 2 mit Ladepuffer (0,01 % [w/v] Bromphenolblau, 0,05 % [v/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 % [v/v] Glycerol) versetzt und für 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht. Die denaturierten Proben wurden dann zusammen mit einem Proteinstandard definierter Größe (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) auf ein vorbereitetes SDS-Gel geladen. Vor dem Lauf wurde die Elektrophorese-Kammer zur Hälfte mit Laufpuffer (190 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3) befüllt und eine Spannung von 60 V an die Kammer angelegt. Nach dem Eindringen der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 100 V erhöht.

### 2.5.4 Silberfärbung

Die von Blum *et al.* entwickelte Methodik der Silberfärbung ist ein hoch-sensitives Verfahren, um die im Zuge der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zu visualisieren. (Blum et al. 1987). Grundlage dieser Färbetechnik ist die Anlagerung von Silberionen an negativ geladene Proteinseitenketten. Durch Zugabe von Formaldehyd erfolgt eine Reduktion dieser Ionen zu sichtbarem, elementarem Silber, ein Vorgang, der Nachweisgrenzen von bis zu 0,1 ng ermöglicht. Die für die Silberfärbung verwendeten Lösungen sowie die dazugehörigen Inkubationszeiten sind nachfolgend in Tabelle 22 dargestellt. Die Gele wurden bis zum Auftreten deutlicher Proteinsignale in Entwickler-Lösung inkubiert. Durch eine zeitnahe Zugabe der Stopp-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und die Gele wurden photographisch dokumentiert.

Tabelle 22: Protokoll zur Silberfärbung von SDS-Gelen.

Lösung	Zusammensetzung	Dauer [min]
Fixier-Lösung	50 % [v/v] Methanol, 12 % [v/v] Essigsäure, 0,05 % [v/v]	60
Spül-Lösung	50 % [v/v] Ethanol	3 x 20
Thiosulfat-Lösung	2 g L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1
Wasch-Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>r</sub>	3 x 0,33
Imprägnier-Lösung	2 g L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub> , 0,075 % [v/v] 37 %-ig Formaldehyd	10
Wasch-Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>r</sub>	2 x 0,33
Entwickler-Lösung	60 g L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,05 % [v/v] 37 %-ig Formaldehyd, 4 mg L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	variabel
Stopp-Lösung	50 % [v/v] Methanol, 12 % [v/v] Essigsäure	∞

### 2.5.5 Immunologische Proteindetektion mittels Western Blot

Neben dem unspezifischen aber sehr sensitiven Protein-Nachweis mittels Silberfärbung können Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE auch durch einen immunologischen Nachweis detektiert werden. Beim Verfahren des Western Blots erfolgt ein spezifischer Nachweis von Protein-Epitopen durch Verwendung von Antikörpern oder speziellen Konjugaten (Towbin et al. 1979). Das in dieser Arbeit für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen genutzte Strep Tag II ermöglicht einen hochspezifischen



Nachweis durch die Verwendung eines Streptactin-Konjugats. Durch Kopplung von Streptactin mit einer Meerrettich-Peroxidase und eine nachgeschaltete Farbreaktion, wird eine spezifische Färbung der rekombinanten Proteine gewährleistet. Die Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation von 4-Chloro-1-naphthol in Anwesenheit des Elektronenakzeptors  $H_2O_2$ . Das entstehende Oxidationsprodukt 4-Chloro-1-naphthol weist eine intensive bläuliche Färbung auf, was sich im Zuge der immunologischen Detektion zu Nutze gemacht wird.

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch das Halbtrocken-Blot-Verfahren zunächst auf eine geeignete Membran aus Nitrocellulose transferiert. Ober- und unterhalb des Gels wurden drei in Towbin-Puffer äquilibrierte Whatman-Paper platziert, bevor für 40 Minuten eine Spannung von 15 V angelegt wurde. Die Zusammensetzung des Towbin-Puffers sowie der übrigen am Blott- und Färbeprozess beteiligten Lösungen ist in Tabelle 23 angegeben.

Tabelle 23: Zusammensetzung der im Zuge des Western Blots verwendeten Lösungen.

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Towbin-Puffer	14,4 g L <sup>-1</sup> Glycerin, 3,04 g L <sup>-1</sup> TRIS, 20 % [v/v] Methanol, pH 8,3
PBS-Lösung	4 mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 115 mM NaCl, 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>r</sub> , pH 7,4
Blockier-Lösung	5 % [w/v] Milchpulver in PBS-Puffer
PBST-Lösung	0,05 % [v/v] Tween 20 in PBS-Lösung
Chromogen	3 % [w/v] 4-Chloro-1-naphthol in Methanol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	30 %-ig [v/v] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, erfolgte nach dem Transfer eine 1-stündige Inkubation der Membran in Blockier-Lösung. Nach dreimaligem Waschen mit PBST-Lösung für jeweils fünf Minuten wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 20 ml PBST-Lösung inkubiert, welchem 5 µl des Strep-Tactin® HRP Konjugats (IBA GmbH; Göttingen, Deutschland) zugegeben wurden. Am nächsten Morgen wurde die Membran zwei mal für jeweils eine Minute in PBST-Lösung und ein mal für eine weitere Minute in PBS-Lösung gewaschen. Zur Ausbildung der Farbreaktion erfolgte die Zugabe von 20 ml PBS-Lösung, 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und 200 µl des Chromogens 4-Chloro-1-naphthol. Bis zum Auftreten sichtbarer Banden wurde die Membran unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Dekantieren der Färbelösung und die Zugabe von H<sub>2</sub>O abgestoppt.

## 2.6 Synthese und Aufreinigung von Zuckerverbindungen

### 2.6.1 Produktion und Aufreinigung des durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten EPS

Um das makroskopisch nachgewiesene EPS, das durch *G. japonicus* LMG 1417 produziert wurde, zu identifizieren, erfolgte eine analytische Untersuchung der entsprechenden Substanz. Um Material in

ausreichender Quantität und Qualität zu generieren, wurde der Stamm *G. japonicus* LMG 1417 in 100 ml einer modifizierten Version des Mediums Nr.13 kultiviert, welches in Tabelle 24 angegeben ist.

Tabelle 24: Zusammensetzung des modifizierten Mediums Nr.13 V2.0. Das Medium wurde für die Levan-Produktion durch *G. japonicus* LMG 1417 verwendet.

<b>Medium Nr. 13 V2.0</b>	
D-Mannitol	0.9 g
Hefeextrakt	5 g
Pepton	3 g
Saccharose	68.4 g

Nach 24-stündiger Inkubation bei 28 °C und dem Abtrennen der Zellen via Zentrifugation (10.000 rpm, 15 min, 10 °C) erfolgte eine ethanolische Fällung des Überstandes. Zu diesem Zweck wurde ein Teil Kulturüberstand mit vier Teilen 96 %-igem Ethanol versetzt und der Ansatz durchmischt. Das in diesem Prozess ausgefällte Material wurde in H<sub>2</sub>O<sub>f</sub> resuspendiert, lyophilisiert und anschließend für analytische Nachweisverfahren (<sup>13</sup>C-NMR- und FTIR-Spektroskopie) eingesetzt.

### 2.6.2 Synthese und Aufreinigung von Levan

Um Levan als Substrat für enzymatische Assays und die in Kapitel 2.6.3 beschriebene Synthese von RBB-Levan einzusetzen, wurde das Fruktan durch die heterolog in *E. coli* NEB5-alpha produzierte und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigte Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 synthetisiert. Für die Produktion wurden 500 ml einer 2 M Saccharose-Lösung, die zuvor durch Zugabe von 5 ml eines 1 M Natrium-Acetat-Puffers auf pH 5 eingestellt wurde, mit 250 µg der rekombinanten Levansucrase versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abnahme der Saccharose-Konzentration wurde mittels HPLC mit Hilfe der Aminex HPX-87H Trennsäule von Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland) verfolgt. Nach einer relativen Saccharose-Umsetzung von 90 % wurden dem Ansatz 2 Liter 96 %-iges [v/v] Ethanol zugesetzt und dieser stark geschüttelt. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das verbleibende, weiße Präzipitat in 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>f</sub> gelöst und in einen Dialyse-Schlauch aus Cellulosehydrat (Nadir®-Dialysierschlauch, Ø = 40 mm, MWCO ~ 10.000 – 20.000) überführt. Für 48 Stunden erfolgte die Dialyse der Levan-Lösung bei 4 °C in 5 L H<sub>2</sub>O<sub>f</sub>. Das Dialyse-Wasser wurde alle 12 Stunden gewechselt. Nach Abschluss des Dialyse-Vorgangs wurde der Inhalt des Schlauchs bei -70 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

### 2.6.3 Synthese und Aufreinigung von RBB-Levan

Remazol Brilliant Blau R (RBB) ist ein Anthrachinon-Farbstoff, der sich im Bereich der Glykochemie und -biologie zur Herstellung kolorimetrisch messbarer Substrate einsetzen lässt. Auf diese Weise konnten spezifische Substrate für die photometrische Aktivitätsbestimmung von zahlreichen Glykosyl-Hydrolasen wie beispielsweise Inulinasen, Cellulasen und Xylanasen entwickelt werden (Biely et al. 1985; Basran et al. 2010; Tiboni et al. 2012). In dieser Arbeit konnte der RBB-Farbstoff kovalent mit

dem Fruktan Levan gekoppelt werden, um die enzymatische Aktivität von Endolevanasen photometrisch zu messen.

Für die Synthese von RBB-Levan wurden 4 g des eigens hergestellten Levans bei 60 °C in 80 ml eines 100 mM Natrium-Acetat-Puffers (pH 5) gelöst. Nach Zugabe von 0,8 g Remazol Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland) wurde der pH der Lösung durch Zugabe von 50 ml einer Salzlösung (500 g L<sup>-1</sup> KCl, 100 g L<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) auf pH 12 eingestellt und die Lösung über Nacht bei 65 °C inkubiert. Durch Zentrifugation des Färbeansatzes (5 min, 4 °C, 6.000 rpm) wurden unlösliche Reaktionsbestandteile abgetrennt und der Überstand für eine ethanolische Fällung eingesetzt. Dafür wurde dieser mit 2,2 Teilen 96 %-igem [v/v] Ethanol versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert (1 min, 4 °C, 6.000 rpm). Das blaue Präzipitat wurde vorsichtig mit Ethanol abgespült und anschließend bei 65 °C in 18 ml eines 50 mM Natrium-Acetat-Puffers (pH 5) gelöst. Der Fällungsschritt sowie das nachfolgende Lösen des Präzipitates in Puffer wurden so lange wiederholt, bis sich ein klarer Überstand einstellte. Das resultierende tiefblaue Pellet wurde final in H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> gelöst und lyophilisiert.

## 2.7 Analytische Methoden

### 2.7.1 <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie

Zur Identifikation des durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten extrazellulären Polysaccharids (EPS) wurde der Stamm auf Medium Nr. 13 + 200 mM Saccharose nach Standardbedingungen kultiviert. Nach 24-stündiger Inkubation und dem Abtrennen der Zellen (8.000 rpm, 15 min, 4 °C) erfolgte eine Fällung des Kulturüberstandes durch Zugabe von vier Teilen 96 %-igem [v/v] Ethanol. Das präzipitierte Material wurde entnommen, luftgetrocknet und für eine <sup>13</sup>C-NMR-Analyse eingesetzt. 10 mg des luftgetrockneten Materials wurden dazu in einem ml Deuterium-Oxid gelöst und für 20 min auf 60 °C erwärmt. Die Lösung wurde in ein NMR-Röhrchen überführt und für die Analyse an die Abteilung für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn übergeben. Als Referenz wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogenes Levan (aus *Erwinia (E.) herbicola*) analog aufbereitet und ebenfalls per <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie analysiert. Die Messungen erfolgten in einem Bruker Avance 300 DPX bei einer Frequenz von 75 MHz und unter Verwendung der Software Topspin 1.3. Für die Auswertung der Spektren wurde die Software MestReNova v8.0.1 genutzt.

### 2.7.2 Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie

Die FTIR-Methodik ist ein bevorzugtes Verfahren in der Infrarotspektroskopie zur Erstellung molekularer „Fingerabdrücke“ und zur Identifikation unbekannter Substanzen. Zwecks Strukturanalyse des durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten EPS wurden FTIR-Spektren im Absorptionsmodus zwischen 400 und 4.000 Wellenzahlen (1 cm<sup>-1</sup>) mit einem Bruker Tensor 27 FT-IR (Bruker Corporation; Billerica, USA) erzeugt. Als Kontrolle wurde kommerzielles Levan von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet, das von *E. herbicola* produziert wurde (Blake et al. 1982). 2 mg des

gereinigten EPS von *G. japonicus* LMG 1417 oder des Referenz-Levans wurden mit 250 mg KBr pulverisiert und zu separaten Pellets gepresst.

### 2.7.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die qualitative und quantitative Analyse von Mono- bis Oligosacchariden konnte sich die Methodik der HPLC-Analyse etablieren. Durch die Interaktion mit einer meist polaren stationären Phase, können die in einer mobilen Phase gelösten Substanzen entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften aufgetrennt werden. Abhängig von der Applikation wurden in dieser Arbeit mehrere Trennsäulen der Hersteller Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland), Knauer GmbH (Berlin, Deutschland) und ShowaDenko (Tokio, Japan) genutzt. Vor allem für die Analyse von Fruktooligosacchariden wurde eine breite Palette an stationären Phasen untersucht, um ein geeignetes Verfahren für eine hochauflösende Trennung von FOS zu etablieren.

Initiale Analysen für die Konzentrationsbestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose in Kulturüberständen von *Gluconobacter* erfolgten auf einer Bio-Rad Aminex HPX-87H, die sich für die Analyse von Mono- und Disacchariden, organischen Säuren und Alkoholen eignet. Die Säule ist aufgebaut aus einer Polymer-basierten Matrix bestehend aus Polystyrol-Divinylbenzol und trennt die Analyten auf Basis der Ionen-moderierten Verteilungschromatographie. Zwei grundlegende Mechanismen kommen bei der Auftrennung mittels Aminex-Trennsäule zum Tragen. Im Zuge der Oligosaccharid-Auftrennung führt das Prinzip des Größenausschlusses dazu, dass die Zuckerketten entsprechend ihres Molekulargewichtes das dicht gepackte Trenn-Harz lateral penetrieren und somit voneinander separiert werden. Ferner erfolgt eine Interaktion zwischen den Hydroxyl-Gruppen der analysierten Kohlenhydrate und den fixierten Gegenionen des Trenn-Harzes. Im Fall der Aminex HPX-87H stellt ionischer Wasserstoff das Gegenion dar. Der Ligandenaustausch wird maßgeblich durch die räumliche Orientierung der Hydroxylgruppen beeinflusst, sodass auch Saccharide mit identischem Molekulargewicht ein variierendes Elutionsverhalten aufweisen. Als mobile Phase wurde 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet.

Messungen unter Verwendung der Aminex HPX-87H erfolgten durch folgendes HPLC-System:

- Entgaser: Knauer Smartline Manager 5000
- Pumpe: Knauer Smartline Pump 1000
- Probenaufgabeventil mit 20 µl Probenschleife: Knauer Smartline Autosampler 3800
- Säulenofen: Knauer Column-Thermostat Jetstream 2 Plus
- UV-Detektor: Knauer Smartline UV Detektor 2600
- RI-Detektor: AZURA RID 2.1L

Neben der Aminex HPX-87H wurden die Säulen Aminex HPX-42A und HPX-42C und verschiedene Aminophasen-Trennsäulen für die chromatographische Analyse von Fruktooligosacchariden untersucht. Die genannten Aminex-Trennsäulen weisen eine geringere Quervernetzung auf und liegen,

anders als die HPX-87H, nicht in der Wasserstoff-Form sondern in der Silber (A)- bzw. Kalzium (C)-Form vor und werden in Kombination mit  $H_2O_r$  als mobiler Phase eingesetzt.

Die getesteten Aminophasen basieren auf einer Kieselgel- oder Polyvinyl-Alkohol-Matrix, deren Hydroxylgruppen über hydrophobe Abstandshalter (Propyl) mit einer endständigen und polaren Aminogruppe verbunden sind. In saurer Lösung liegen diese Aminogruppen protoniert vor, sodass die Matrix als schwacher Anionenaustauscher fungiert. Die im Zuge des enzymatischen Levan-Abbaus freigesetzten Fruktooligosaccharide können aufgrund ihrer polaren Eigenschaften durch die beschriebene Aminophase separiert werden. Unter Verwendung der Aminophasen-Säulen wurden variierende Acetonitril-Konzentrationen (60 - 80 % [v/v]) getestet.

Alle Messungen zur qualitativen und quantitativen Analyse von FOS erfolgten an folgendem HPLC-System:

- Entgaser: SpectraSystem SCM1000 Vakuum Entgaser
- Pumpe: SpectraSystem P4000 Gradienten-Pumpe
- Probenaufgabeeventil mit 20 µl Probenschleife: SpectraSystem AS3000 Autosampler
- RI-Detektor: Ercatech AG Brechungsindex-Detektor RI-101

Folgende Säulen wurden hinsichtlich ihrer Trenneigenschaften für die Analyse von FOS getestet:

- Aminex HPX-42A (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland)
- Aminex HPX-42C (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland)
- Europher II 100-5 NH<sub>2</sub>, 250 x 40 mm (Knauer GmbH; Berlin, Deutschland)
- Europher II 100-3 NH<sub>2</sub>, 250 x 40 mm (Knauer GmbH; Berlin, Deutschland)
- Shodex Asahipak NH2P-50 3E in Kombination mit der Vorsäule Asahipak NH2P-50G 3A und dem Line-Filter Asahipak NH2P-LF (Showa Denko K.K.; Tokio, Japan)

Vor der Probenaufgabe wurden die Proben so mit Laufmittel verdünnt, dass die Konzentration der Probenmatrix möglichst der Konzentration des Laufmittels entsprach. Alle Proben wurden vor der Messung für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Partikel abzutrennen.

### **2.7.3.1 Probenvorbereitung für die HPLC-Analytik**

Alle Proben, in denen Levan synthetisiert oder als Substrat verwendet wurde, wurden vor der chromatographischen Analytik mit vier Teilen 96 %-igem [v/v] Ethanol versetzt. Polymeres Levan wurde durch Vortexen der Proben präzipitiert und durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min, RT) pelletiert. Proben, die an der Aminex HPX-87H analysiert wurden, wurden so mit einer 5 mM  $H_2SO_4$ -Lösung verdünnt, dass das Ausgangssubstrat in einer Endkonzentration von 5 mM vorlag.

Erste Analysen auf den Säulen Aminex HPX-42A und HPX-42C zeigten, dass unter Verwendung dieser stationären Phasen Ethanol mit Fruktose co-eluierte. Um das im Zuge der Polymer-Fällung in die Probenmatrix eingebrachte Ethanol zu entfernen und so die Quantifizierung von Fruktose zu

ermöglichen, wurden alle Proben, die mit Hilfe dieser Säulen analysiert wurden, durch den Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25 CDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; Osterode am Harz, Deutschland) eingedampft und anschließend in  $\text{H}_2\text{O}_f$  gelöst. Die Proben wurden anschließend so verdünnt, dass die finale Konzentration der Fruktose-Äquivalente summiert bei 25 mM lag.

Bevor Proben mit Hilfe der erwähnten Aminophasen analysiert werden konnten, wurden der Überstand der ethanolischen Polymer-Fällung so mit Acetonitril versetzt, dass die Acetonitril-Konzentration der Probenmatrix der Acetonitril-Konzentration des Laufmittels entsprach. Je nach Analyt variierte die Konzentration der analysierten Zucker zwischen 1 – 25 mM.

### **2.7.4 Molekulargewichtsbestimmung von Levan mittels asymmetrischer Flussfeld-Fluss-Fraktionierung**

Das Molekulargewicht und der quadratische Mittelwert (rms) des durch den Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417 produzierten Levans, wurden mittels asymmetrischer Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4; Eclipse Dualtec, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA), gekoppelt mit Mehrwinkel-Laserlichtstreuung (MALLS) (Dawn Heleos II, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) und UV-Detektion (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Uarak et al. 2017; Hundschell et al. 2020). Das lyophilisierte Levan wurde in  $\text{d}_4\text{H}_2\text{O}$  bis zu einer Endkonzentration von  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  gelöst.  $10 \mu\text{g}$  ( $100 \mu\text{l}$ ) dieser Levan-Lösung wurden in den Trennkanal (LC) injiziert, der mit einer 10 kDa Zellulosemembran (Nadir regenerierte Zellulose) und einem Abstandshalter (Höhe:  $350 \mu\text{m}$ ; Breite:  $21,5 \text{ mm}$ ) ausgestattet war. Die Trennungen wurden mit  $50 \text{ mM NaNO}_3$  als Eluent, einer konstanten Detektorflussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  und einem Querflussgradienten von  $3 \rightarrow 0,1 \text{ mL min}^{-1}$  ( $15 \text{ min}$ ) durchgeführt, gefolgt von  $15 \text{ min}$  eines gleichmäßigen Querflusses von  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ . Die erzeugten Signale wurden mit der Software ASTRA 6 (Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA, USA) unter Verwendung eines  $\text{dn/dc}$ -Wertes von  $0,146 \text{ mL g}^{-1}$  und des in die ASTRA 6-Software integrierten Zufallsspulenmodells aufgezeichnet, transformiert und ausgewertet.

## **2.8 Enzymatische Nachweismethoden**

Alle kontinuierlichen Enzym-Assays wurden mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco GmbH; Pfungstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Spectra Manager II Software.

### **2.8.1 Quantifizierung von Enzymaktivitäten**

Aktivitäten werden in dieser Arbeit mit der Einheit Units (U) ausgedrückt, wobei 1 U der Umsetzung von  $1 \mu\text{mol}$  Substrat  $\text{min}^{-1}$  entspricht. Photometrisch bestimmte Volumenaktivitäten wurden durch das in Formel 3 angegebene Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet.

Formel 3: Berechnung der enzymatischen Volumenaktivität.  $\Delta E \text{ min}^{-1}$  entspricht der Extinktionsänderung pro Minute,  $d$  der Schichtdicke des durchstrahlten Körpers in cm,  $\varepsilon$  dem dekadischen Extinktionskoeffizienten ( $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $V$  dem Assay-Volumen in ml und  $v$  dem Volumen der zugefügten Enzym-Lösung in ml.

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

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die Volumenaktivität durch die Protein-Konzentration ( $\text{mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ) der verwendeten Enzym-Lösung geteilt. Indem die spezifische Aktivität von Enzymen bei variierenden Substratkonzentrationen ermittelt wird, kann eine Aussage über das kinetische Verhalten des untersuchten Enzyms getroffen werden. Alle in dieser Arbeit beschriebenen, rekombinanten Enzyme verhielten sich nach dem kinetischen Modell von Michaelis-Menten. Mittels nicht-linearer Regression können auf Basis dieses kinetischen Modells die Michaeliskonstante  $K_m$  sowie die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  ermittelt werden. Die Bestimmung dieser Kenngrößen erfolgte durch die Software Graph-Pad Prism 8.4.

Ausgehend von der spezifischen Aktivität erfolgte anhand von Formel 4 die Bestimmung der Wechselzahl  $K_{\text{cat}}$ , die die Substratumsetzung  $\text{Enzym}^{-1} \text{ Sekunde}^{-1}$  beschreibt.

Formel 4: Berechnung der Wechselzahl  $K_{\text{cat}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ).

$$K_{\text{cat}}(\text{sec}^{-1}) = \frac{\left( \frac{\text{Spezifische Aktivität } (\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1})}{60} \right)}{\text{Stoffmenge des Enzyms } (\mu\text{mol mg}^{-1})}$$

Durch Division der Wechselzahl  $K_{\text{cat}}$  durch die Michaeliskonstante  $K_m$  ergibt sich die katalytische Effizienz  $K_{\text{cat}} K_m$  ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) eines Enzyms.

### 2.8.2 Enzymatischer Nachweis von Glukose

Die Aktivität von Invertasen und Levansucrasen kann durch einen gekoppelten Enzym-Assay photometrisch bestimmt werden. Diese Quantifizierung basiert auf der Freisetzung von Glukose-Einheiten im Zuge der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von Saccharose. Das von Megazyme Ltd. (Bray, Irland) vertriebene E-HKGDH-Gemisch ermöglicht eine Umsetzung der freigesetzten Glukose durch die Hilfsenzyme Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, was in einer photometrisch messbaren, äquimolaren Reduktion von  $\text{NADP}^+$  resultiert. Diese Reduktion kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden. Der genaue Mechanismus der Reaktion ist nachfolgend in Abbildung 3 abgebildet.

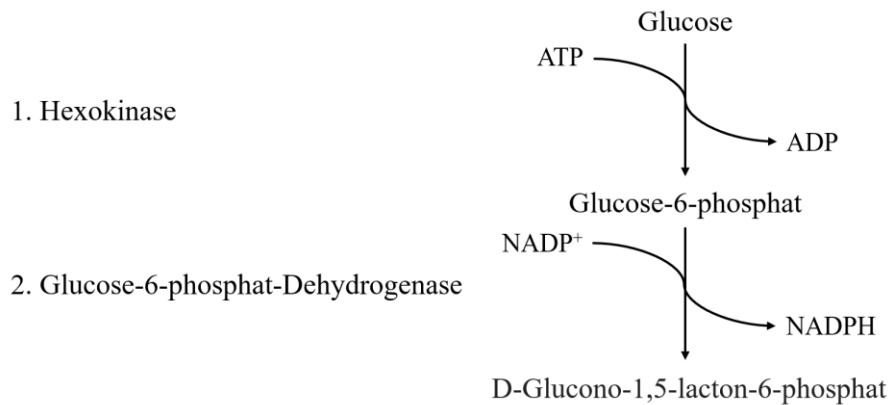


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus der durch das HKGDH-Gemisch (Megazyme; Bray, Irland) katalysierten Glukose-Umsetzung. Die Umsetzung der Glukose kann durch die äquimolare Reduktion von  $\text{NADP}^+$  bei 340 nm photometrisch analysiert werden.

Um die relative Levansucrase-Aktivität in verschiedenen Zellfraktionen von *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 zu messen, wurden die entsprechenden Stämme im Medium Nr. 13 bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 1,5 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8.000 rpm, 10 min bei 4 °C) geerntet, in 10 ml Puffer W (IBA GmbH, Göttingen) resuspendiert und durch Sonifizierung lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation (15.000 rpm, 15 min bei 4 °C) des Lysats entfernt. Die Durchführung der photometrischen Quantifizierung erfolgte nach Herstellerangaben (Megazyme; Bray, Irland). Durch Verwendung des NADPH Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{340\text{nm}}$ ) von  $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  konnte anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes (siehe Formel 3) die Volumenaktivität der eingesetzten Fraktionen ermittelt werden.

Des Weiteren wurde mit Hilfe des E-HKGDH-Gemischs die Aktivität des als Levansucrase annotierten und rekombinant in *E. coli* NEB5-alpha produzierten Proteins (GenBank-Eintrag: KXV26505.1) aus *G. japonicus* LMG 1417 ermittelt.

### 2.8.3 Enzymatische Reinheitskontrolle im Zuge der Zellfraktionierung

Um die Reinheit präparierter Zellfraktionen von *G. japonicus* LMG 1417 zu validieren und den Anteil lytischer Zellen bestimmen zu können, erfolgte die Aktivitätsbestimmung der nativ cytosolischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in entsprechenden Fraktionen. Für die Messung wurde der in Tabelle 25 beschriebene Reaktionsansatz kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Tabelle 25: Reaktionsansatz zur Bestimmung der Glukose-6-phosphat Dehydrogenase Aktivität in Zellfraktionen von *G. japonicus* LMG 1417.

Komponente	Menge [ $\mu\text{l}$ ]
25 mM $\text{NADP}^+$	10
0,5 M Glukose-6-phosphat	5
Zellfraktion	10
50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5)	975



### 2.8.4 RBB-Levan basierte Aktivitätsbestimmung von Endolevanasen

Die in dieser Arbeit durchgeführte Synthese von RBB-Levan ermöglichte eine Aktivitätsbestimmung von Endolevanasen durch diskontinuierlich durchgeführte photometrische Messungen. Grundlage dafür ist die Präzipitierbarkeit des gefärbten Fruktans durch Zugabe von Ethanol. Im Zuge einer Endolevanase-vermittelten Hydrolyse des kolorimetrischen Substrats erfolgt die Akkumulation von gefärbten, nicht präzipitierbaren Oligosacchariden. Diese in Ethanol löslichen Verbindungen führen mit zunehmender Inkubationszeit zu einer Intensivierung der Blaufärbung des Fällungsüberstandes. Durch den spezifischen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{592} = 6,170 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  ermöglichte das an das Substrat gekoppelte Remazol Brilliant Blau R eine Quantifizierung der enzymatisch freigesetzten Fruktose-Äquivalente. Eigens synthetisiertes RBB-Levan wurde für den in Tabelle 26 dargestellten Reaktionsansatz eingesetzt.

Tabelle 26: Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung von Endolevanasen unter Verwendung von RBB-Levan.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [<math>\mu\text{l}</math>]</b>
100 mM RBB-Levan	180
10X McIlvaine Puffer pH 6	5
Endolevanase	X
H <sub>2</sub> O <sub>r</sub>	15-X

Entsprechende Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen beprobt. Dafür wurden 20  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung entnommen, mit 80  $\mu\text{l}$  96 %-igem Ethanol versetzt und für 20 Sekunden gevortext. Das entstehende Präzipitat wurde mittels Zentrifugation (13.000 rpm, 3 min, Raumtemperatur) abgetrennt. 60  $\mu\text{l}$  des resultierenden Überstandes wurden in eine 96-well Multiwellplatte überführt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 592 nm analysiert.

### 3. Ergebnisse

Um neue Verbindungen für den präbiotischen Markt zugänglich zu machen, bedarf es effizienter Produktionsverfahren für entsprechende Präbiotika. Aufgrund der hohen Komplexität der humanen Mikrobiota und zahlreicher Cross-Feeding-Effekte im Darm, verlangt die wissenschaftliche Gemeinschaft höchste Standards für den experimentellen Nachweis eines präbiotischen Effektes. Zurzeit werden ausnahmslos Placebo-kontrollierte Blindstudien am Menschen oder an Tieren berücksichtigt, um eine Kausalität zwischen einem potenziellen Präbiotikum und positiven Veränderungen spezifischer Gesundheits-Marker nachzuweisen (Gibson et al. 2017). Für zahlreiche Verbindungen fehlen jedoch die kommerzielle Verfügbarkeit oder geeignete Produktionsverfahren, um solche Tests in ausreichendem Umfang durchführen zu können, so auch für Levan-basierte FOS. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Etablierung eines effizienten Produktionsverfahrens für präbiotische, Levan-basierte Fruktooligosaccharide.

#### 3.1 Identifizierung von Levan-Produzenten innerhalb der Gattung *Gluconobacter*

Aufgrund der Fähigkeit zur schnellen, unvollständigen Oxidation von Zuckerderivaten und Alkoholen und der damit verbundenen Akkumulation von regio- und stereoselektiven Oxidationsprodukten, konnte sich die Gattung *Gluconobacter* für zahlreiche industrielle Applikationen etablieren (Gupta et al. 2001). Prominente Bereiche, in denen Vertreter der Gattung für industrielle Verfahren eingesetzt werden, sind die Produktion von Vitamin C (Reichstein & Grüssner 1934), 1-Deoxynojirimycin sowie Miglitol (Schedel 2008), Glukonaten (Deppenmeier et al. 2003) und Dihydroxyaceton (Claret et al. 1994). Auch in Bereichen der Glykobiologie konnte sich die Gattung *Gluconobacter* als geeignete Produktionsplattform beweisen, zum Beispiel für die Produktion des Süßstoffes 5-Keto-D-Fruktose (Herweg et al. 2018; Siemen et al. 2018; Battling et al. 2020; Hoffmann et al. 2020) und für Fruktane des Levan-Typs (Jakob et al. 2012; Ua-Arak et al. 2017; Hövels et al. 2020). Es besteht großes Potenzial, die hohe Osmotoleranz (Luchterhand et al. 2015; Zahid et al. 2015) und genetische Zugänglichkeit (Kallnik et al. 2010; Peters et al. 2013; Kiefler et al. 2017) von *Gluconobacter* für eine effiziente und nachhaltige Umwandlung von nachwachsenden Rohstoffen in funktionelle Zuckerverbindungen zu nutzen. Der Fokus in dieser Arbeit lag in diesem Zusammenhang auf Fruktanen des Levan-Typs, die nachweislich probiotische Mikroorganismen in ihrem Wachstum und/oder ihrer Aktivität fördern können (Marx et al. 2000; Porras-Domínguez et al. 2014; Adamberg et al. 2015).

##### 3.1.1 Screening nach EPS-produzierenden *Gluconobacter* Arten

Auf Basis der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, dass Vertreter der Gattung *Gluconobacter* zur Synthese des  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktan-Polymers Levan befähigt sind, erfolgte in dieser Arbeit ein initiales Screening nach potenziellen Levan-produzierenden *Gluconobacter*-Stämmen. Insgesamt sechs Vertreter der Gattung wurden dafür vergleichend auf Hefe-Mannitol-(YM)-Agar

(Abbildung 4A) und Hefe-Saccharose-(YS)-Agar (Abbildung 4B) kultiviert. Die Produktion von Levan, bei der Saccharose zwingend als Substrat für die Levansucrase-vermittelte Transfruktosylierungsreaktion benötigt wird, äußert sich auf Agar-Platten durch eine schleimige Kolonien-Morphologie (Jakob et al. 2012).

Die sechs untersuchten Stämme *G. japonicus* LMG 1417, *G. cerinus* LMG 1425, *G. oxydans* LMG 1385, *G. oxydans* DSM 2003, *G. oxydans* DSM 3504 und *G. oxydans* 621H zeigten auf YM-Agar erwartungsgemäß deutlich erkennbares Wachstum (Abbildung 4A).

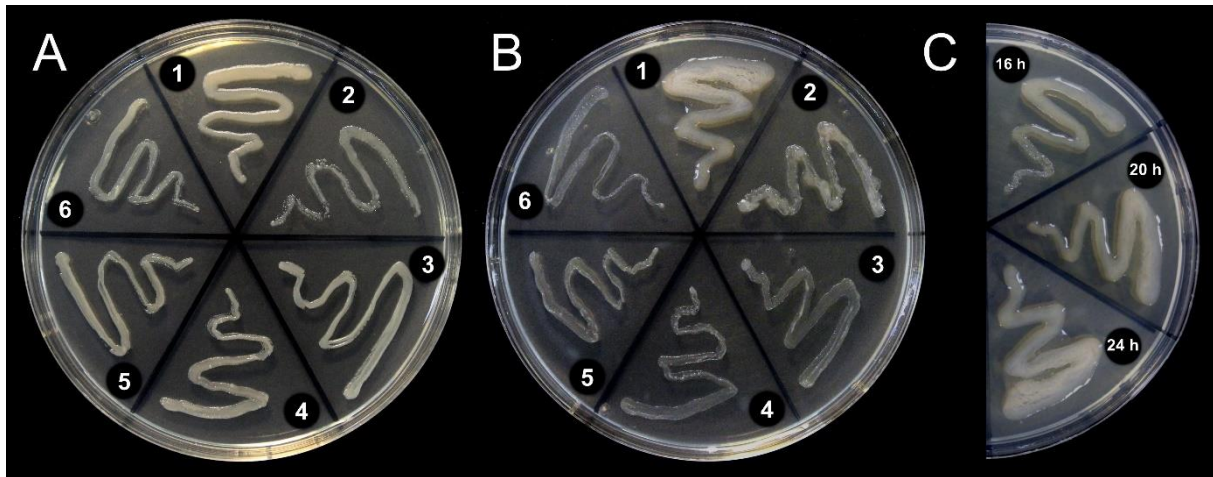


Abbildung 4: Makroskopische Morphologie verschiedener *Gluconobacter*-Stämme auf Hefe-Mannitol-Agar (A) und Hefe-Saccharose-Agar (B). Die Stämme *G. japonicus* LMG 1417 (1), *G. cerinus* LMG 1425 (2), *G. oxydans* LMG 1385 (3), *G. oxydans* DSM 2003 (4), *G. oxydans* DSM 3504 (5) und *G. oxydans* 621H (6) wurden 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. *G. japonicus* LMG 1417 wurde zusätzlich nach 16, 20 und 24 Stunden Inkubation fotografiert (C).

Auf YS-Platten wurde die Bildung von schleimigen Kolonien bei den Stämmen *G. japonicus* LMG 1417, *G. cerinus* LMG 1425 und *G. oxydans* LMG 1385 beobachtet, während die übrigen Stämme keine Anzeichen von Polysaccharid-Bildung zeigten (Abbildung 4B). Von allen untersuchten Organismen zeigte *G. japonicus* LMG 1417 die mit Abstand stärkste Produktion eines extrazellulären Polysaccharids (EPS), was durch die Zeitraffer-Aufnahme verdeutlicht wird (Abbildung 4C).

### 3.1.2 Identifizierung des durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten EPS

#### 3.1.2.1 <sup>13</sup>C-NMR-Analyse des unbekanntes EPS

Um das in Kapitel 3.1.1 beschriebene EPS identifizieren zu können, wurde der Organismus *G. japonicus* LMG 1417 in Saccharose-haltigem Flüssigmedium kultiviert. Das durch ethanolische Fällung aus dem Kulturüberstand gewonnene Präzipitat zeigte in der <sup>13</sup>C-NMR-Analyse sechs verschiedene Resonanzsignale bei 105,51 (C2), 81,61 (C5), 77,51 (C3), 76,46 (C4), 64,7 (C6) und 61,11 (C1) ppm (Abbildung 5). Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, entsprachen diese chemischen Verschiebungen denen des Levan-Standards von *E. herbicola*, was bestätigte, dass es sich bei dem produzierten EPS um das β-2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktan-Polymer Levan handelte. Die zwei zusätzliche Signale bei 58,72 und 18,06 ppm konnten dem Fällungsreagenz Ethanol zugeordnet werden (Gottlieb et al. 1997).

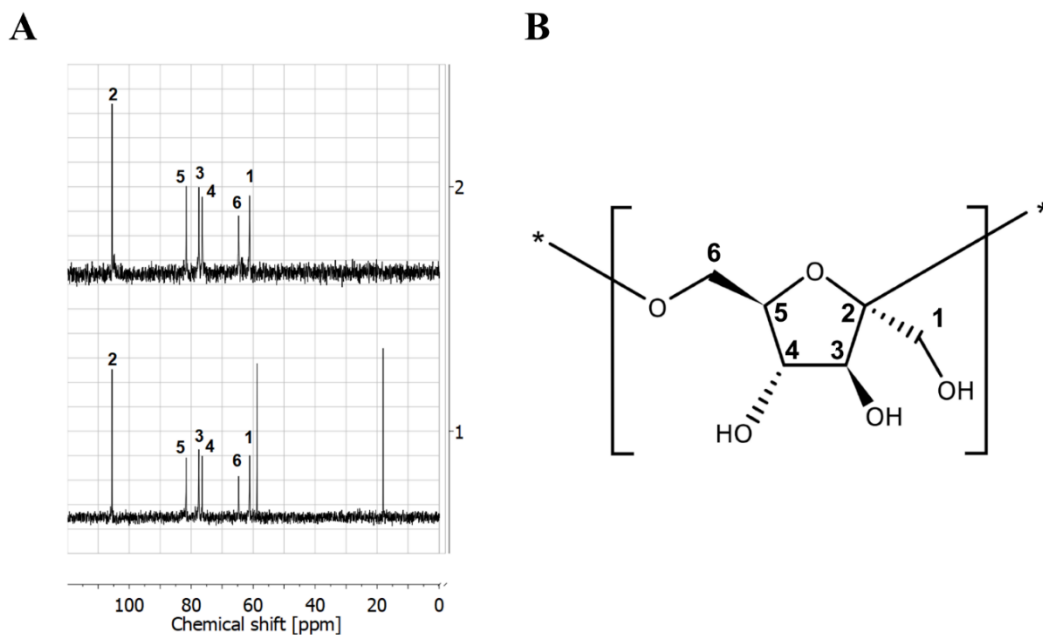


Abbildung 5: <sup>13</sup>C-NMR-Spektren (A) und Strukturformel von Levan (B). Dargestellt sind die chemischen Verschiebungen in ppm von Levan, produziert durch *G. japonicus* LMG 1417 (1) und *E. herbicola* (2). Die Peaks sowie die Kohlenstoff-Atome der Levan-Strukturformel wurden einheitlich zu Tabelle 27 nummeriert.

Tabelle 27 verdeutlicht, dass die in dieser Arbeit gemessenen Signalverschiebungen mit den Signalverschiebungen anderen Levan-Präparationen, die von anderen Essigsäurebakterien erzeugt wurden, übereinstimmen (Jakob et al. 2013).

Tabelle 27: Vergleich der <sup>13</sup>C-NMR-Verschiebungen von verschiedenen Levan- und Inulin-Präparationen.

Levan-Präparationen + Inulin-Standard	Verschiebung (ppm)					
	Kohlenstoff-Atom					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>G. japonicus</i> LMG 1417	61,11	105,52	77,51	76,46	81,61	64,7
<i>E. herbicola</i>	61,12	105,51	77,51	76,45	81,6	64,7
<i>G. frateurii</i> TMW 2.767 <sup>a</sup>	62,32	106,71	78,72	77,66	82,8	65,9
<i>G. cerinus</i> DSM 9533T <sup>a</sup>	62,71	107,08	79,11	78,04	83,17	66,26
<i>Neosaira chiangmaiensis</i> NBRC 101099 <sup>a</sup>	62,57	107,09	79,11	78,04	83,18	66,28
<i>Kozakia baliensis</i> DSM 14400 <sup>a</sup>	62,57	106,97	78,98	77,92	83,06	66,16
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> NCI 1005 <sup>b</sup>	62,6	106,9	79	77,9	83	66
Inulin <sup>a</sup>	63,71	106,1	79,78	77,07	83,91	64,97

<sup>a</sup> entnommen aus der Publikation von Jakobs und Kollegen (Jakob et al. 2013).

<sup>b</sup> entnommen aus der Publikation von Tajima und Kollegen (Tajima et al. 1997)

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Verschiebungen wiesen zwar einen Shift von +1,2 ppm gegenüber den Levanen aus *G. frateurii*, *G. cerinus*, *Neosassa chiangmaiensis*, *Kozakia baliensis* und *Gluconacetobacter xylinum* auf, der interne Abstand der Verschiebungen der einzelnen Kohlenstoffatome war jedoch bei allen Levan-Präparationen gleich.

### 3.1.2.2 Analyse des LMG 1417 Levans mittels FTIR-Spektroskopie

Neben der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie wurde zusätzlich die FTIR-Spektroskopie eingesetzt, um das in Kapitel 3.1.1 beschriebene EPS zu identifizieren. Die FTIR-Spektren des von *G. japonicus* LMG 1417 produzierten Levans und des Referenz-Levans aus *E. herbicola* waren einheitlich und wurden nach Barone und Medynets (2007) ausgewertet (Abbildung 6). Die erhaltenen Spektren zeigten einen charakteristischen Dehnungs-O-H-Peak bei  $3418\text{ cm}^{-1}$ , eine schwache C-H-Schwingung zwischen  $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ , eine H-O-H-Schere bei der Wellenzahl von  $1637,5\text{ cm}^{-1}$  und die typische „Carbohydrate-Fingerprint“-Region zwischen  $1400 - 800\text{ cm}^{-1}$ .

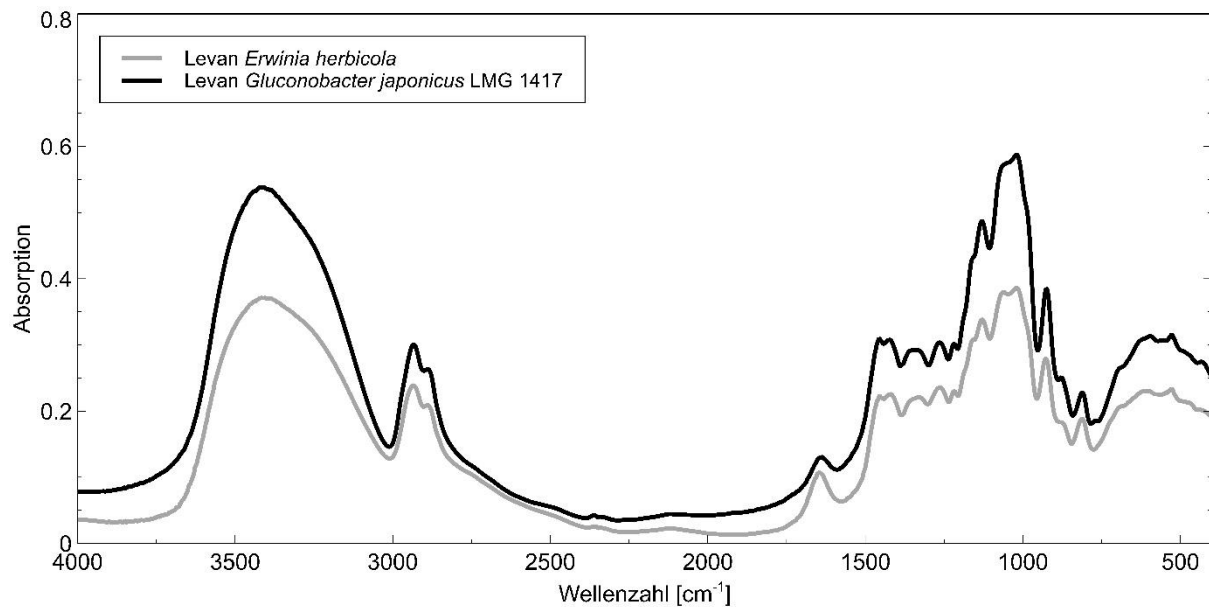


Abbildung 6: FTIR-Spektren des Levans von *G. japonicus* LMG 1417 (schwarz) und kommerziellen Levans, das von *E. herbicola* produziert wurde (grau).

Der interne Abgleich der „Carbohydrate-Fingerprint“-Regionen, der nachfolgend in Tabelle 28 dargestellt ist, zeigte eine hohe Übereinstimmung der detektierten Verschiebungen für die Levan-Präparationen aus *G. japonicus* LMG 1417 und *E. herbicola*.

Trotz eines geringen Shift in den gemessenen Verschiebungen im direkten Vergleich zu den Messwerten von Barone & Medynets lieferten die FTIR-Analysen einen validen Nachweis dafür, dass es sich bei dem EPS, das von *G. japonicus* LMG 1417 produziert wurde, um Levan handelte (Barone & Medynets 2007).

Tabelle 28: FTIR-Verschiebungen der „Carbohydrate-Fingerprint“-Region verschiedener Levan-Präparationen.

Bindungscharakter	Verschiebung in cm <sup>-1</sup>		
	<i>B. subtilis</i> Levan <sup>a</sup>	<i>G. japonicus</i> LMG 1417 Levan	<i>E. herbicola</i> Levan
$\delta(\text{CH}), \delta(\text{OH})^b$	1398	1350,1	1346,3
$\delta(\text{CH}), \delta(\text{OH})$	1370	1338,5	1328,9
$\nu(\text{CH})^b$	1265	1263,3	1263,3
$\nu(\text{CH})$	1248		
$\nu(\text{CO})$ Bindung	1165	1130,2	1128,3
$\nu(\text{CO})$ Bindung	1093	1060,8	1060,8
$\nu(\text{O})$ Furanose-Ring	945	925,8	927,7
$\nu(\text{O})$ Furanose-Ring	813	811,9	811,9

<sup>a</sup> entnommen aus der Publikation von Barone & Medynets (Barone & Medynets 2007).

<sup>b</sup> Vibrationsarten:  $\delta$  = „Stretching“-Vibration;  $\nu$  = „Bending“-Vibration

## 3.2 Charakterisierung der Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417

### 3.2.1 Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Levansucrase LevS1417

Durch den analytischen Nachweis, dass *G. japonicus* LMG 1417 zur Synthese des  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktan-Polymers Levan befähigt ist, wurde aufgedeckt, dass im Genom des Organismus eine entsprechende Levansucrase codiert sein muss. Um den Vorgang der Levan-Produktion durch *G. japonicus* LMG 1417 näher untersuchen und optimale Produktionsparameter für das Präbiotikum bestimmen zu können, wurde zunächst eine Charakterisierung der unbekanntenen Levansucrase vorgenommen. Bioinformatisch konnte im Genom des Essigsäurebakteriums ein Gen identifiziert werden, das für ein als Sucrase annotiertes Protein kodiert (GenBank-Eintrag: KXV23964.1). Zwecks Proteincharakterisierung wurde das entsprechende Gen aus genomischer DNA von *G. japonicus* LMG 1417 amplifiziert. Die dafür verwendeten Oligonukleotide p5\_levS1417\_for und p5\_levS1417\_rev führten zur Integration einer *SacII* Schnittstellen stromaufwärts und einer *XhoI* Schnittstelle stromabwärts der kodierenden Sequenz. Durch einen Verdau der aufgereinigten Amplifikate und des pASK-IBA5 Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *XhoI*, konnte in einer nachfolgenden Ligation das Plasmid pASK5\_levS1417 generiert werden (Abbildung 7A). Nach Transformation des konstruierten Plasmids in *E. coli* NEB5-alpha konnte durch Kolonie-PCR und anschließende Sequenzierung der aus einem Transformanten isolierten Plasmid-DNA, die Klonierung verifiziert werden. Im Zuge der Kolonie-PCR, für die das Primerpaar pASK\_for und p5\_levS1417\_rev eingesetzt wurde, konnte ein Fragment erzeugt werden, welches der prognostizierten Größe von 1497 Basenpaaren entsprach (Abbildung 7B).

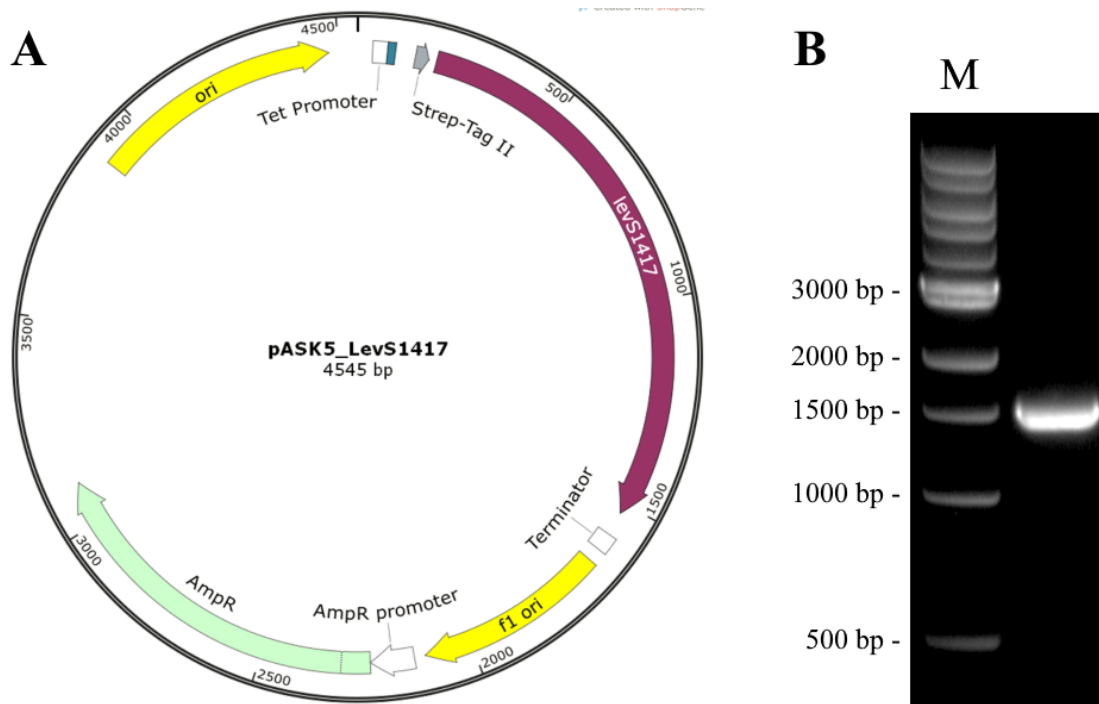


Abbildung 7: Plasmidkarte des Überexpressionsplasmids pASK5\_levS1417 zur heterologen Produktion der Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 in *E. coli* NEB5-alpha (A), und UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR (B) zur Verifizierung des Stammes *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417. Als Referenzmarker (M) wurde die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

Für die heterologe Produktion der Levansucrase LevS1417 wurde der generierte Stamm *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417 gemäß dem in Kapitel 2.5.1 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine beschriebenen Protokoll kultiviert. Der im Anschluss an die Kultivierung erzeugte Zellextrakt wurde für eine affinitätschromatographische Aufreinigung Strep-Tag-gekoppelter Proteine eingesetzt.

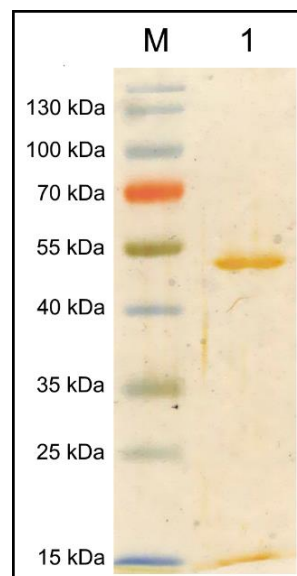


Abbildung 8: Visualisierung der durch *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417 produzierten und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigten Levansucrase LevS1417. Das prognostizierte Molekulargewicht der rekombinanten Levansucrase liegt bei 51,2 kDa. Als Referenzstandard (M) diente die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland).

Mittels Proteinquantifizierung nach Bradford wurde im Anschluss an die Streptactin-Aufreinigung in den Elutionsfraktionen eine summierte Protein-Ausbeute von 11,5 mg detektiert. Um die Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Levansucrase zu bestätigen und die Reinheit der Eluate zu untersuchen, wurden die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung angefärbt (Abbildung 8). Die resultierende Proteinbande entsprach der erwarteten Molekularmasse von 51,2 kDa für die Levansucrase. In den Enzympräparaten wurden keine Verunreinigungen nachgewiesen.

### 3.2.2 Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Levansucrase LevS1417

Um die optimalen Reaktionsbedingungen der Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 zu ermitteln, erfolgte eine detaillierte enzymatische Charakterisierung. Dafür wurde das rekombinante Enzym in Assays mit variierenden Temperatur- oder pH-Werten eingesetzt, in denen Saccharose als Substrat diente. Über die Freisetzung monomerer Glukose-Einheiten wurde die Aktivität der Levansucrase ermittelt. Die quantitative Detektion von Glukose erfolgte chromatographisch unter Verwendung der Trennsäule Aminex HPX-87H (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland) und eines Brechungsindexdetektors. Erwartungsgemäß für ein von einem Essigsäurebakterium produziertes extrazelluläres Enzym, zeigte LevS1417 eine Adaption an einen leicht sauren pH (Matsushita et al. 1989; Gupta et al. 2001). Das aufgereinigte Protein wies eine optimale Aktivität bei pH 5 auf (Abbildung 9). Bei pH-Werten von 3 und 7 nahm die Aktivität um 40 % ab. Durch die Erstellung eines Temperaturprofils konnte gezeigt werden, dass LevS1417 bei 50 °C maximale Aktivität ausübte, in diesem Temperaturbereich allerdings nur kurzzeitig stabil war. Bei Temperaturen über 50 °C wurde ein rascher Aktivitätsabfall beobachtet, bis zu einem totalen Aktivitätsverlust bei 80 °C. Ein Langzeit-Assay bei verschiedenen Inkubationstemperaturen konnte bestätigen, dass LevS1417 unter physiologischen Bedingungen (pH 5 & 30 °C) hohe Stabilität aufweist. So zeigte das Enzym nach 220-stündiger Inkubation bei 30 °C noch 90 % der relativen Ausgangsaktivität.

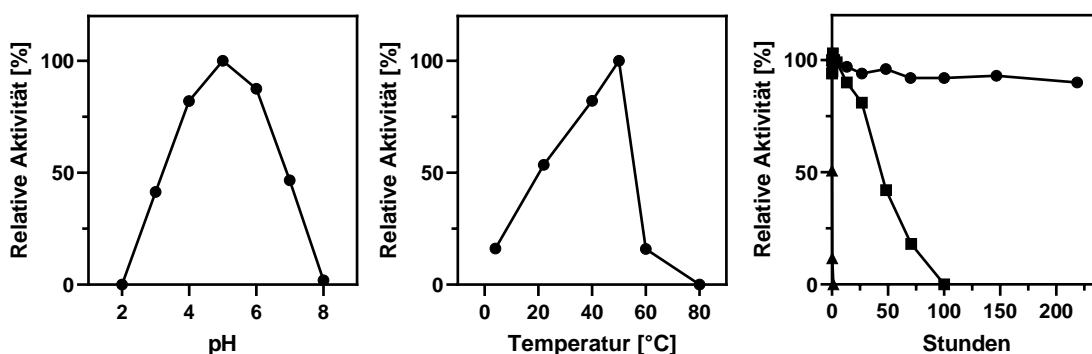


Abbildung 9: pH-Spektrum, Temperatur-Profil und Temperatur-Stabilität der rekombinanten Levansucrase LevS1417. Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* NEB5-alpha produziert und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das pH-Spektrum wurde unter Verwendung des McIlvaine-Puffersystems evaluiert. Die dargestellten Aktivitäten in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur wurde mittels HPLC über die Freisetzung von Glukose-Einheiten bestimmt. Die Temperaturstabilität des Enzyms wurde bei 30 °C (●), 40 °C (■) und 55 °C (▲) untersucht.



Die Bestimmung der spezifischen Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen konnte belegen, dass sich LevS1417 kinetisch nach dem Michaelis-Menten-Modell verhält (Abbildung 10). Mittels nicht-linearer Regression konnte ein  $V_{\max}$  von  $2826 \pm 102,5 \text{ U mg}^{-1}$  und ein  $K_m$ -Wert von  $158,6 \pm 21,8 \text{ mM}$  ermittelt werden, was einem  $k_{\text{cat}}$  von  $2411 \pm 87 \text{ s}^{-1}$  und einem  $k_{\text{cat}} K_m^{-1}$  von  $15,2 \pm 0,5 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  entsprach.

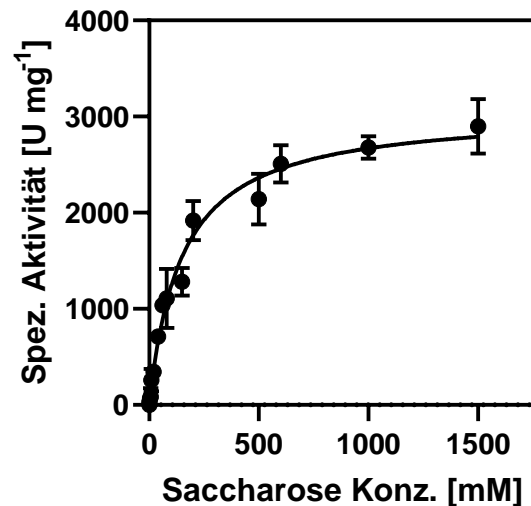


Abbildung 10: Michaelis-Menten-Kinetik der rekombinanten Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417. Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* NEB5-alpha produziert und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Herstellung des kinetischen Modells wurde die Levansucrase mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen getestet. Durch Verwendung eines Natrium-Acetat-Puffer wurde der pH-Wert der Reaktionen auf pH 5 eingestellt. Die finale Konzentration des Puffers im Assay betrug 50 mM.

Im Hinblick auf die BRENDA-Enzym-Datenbank (Jeske et al. 2019) und neuere Übersichtsarbeiten zu den kinetischen Parametern von Levansucrasen weist LevS1417 von *G. japonicus* LMG 1417 die höchste spezifische Aktivität ( $V_{\max}$ ) aller bisher beschriebenen Levansucrasen auf (Hill et al. 2019; Xu et al. 2019).

### 3.2.3 *In-vitro*-Levanproduktion durch die rekombinante Levansucrase LevS1417

Die Enzymcharakterisierung konnte das Temperatur- und pH-Optimum der Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 aufdecken und zeigte, dass das Enzym sehr hohe Saccharose-Konzentrationen toleriert. Diese Erkenntnisse wurden dann genutzt, um mit gereinigtem Enzym eine *in-vitro*-Levanproduktion durchzuführen. Eine möglichst hohe Startkonzentration des Substrates Saccharose sollte in Kombination mit der sehr hohen spezifischen Aktivität der Levansucrase möglichst hohe Ausbeuten des  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktan-Polymers Levan erzielen. Die Reaktion, die in einem 900  $\mu\text{l}$  Maßstab durchgeführt, durch Zugabe von Natrium-Acetat-Puffer auf pH 5 eingestellt (finale Konzentration 50 mM) und bei 30 °C inkubiert wurde, erfolgte durch Zugabe von 5  $\mu\text{g}$  rekombinanter Levansucrase. Wie der Verlauf der enzymatischen Reaktion zeigt, wurde die Saccharose-Konzentration, die zum Startpunkt der Reaktion bei  $2,19 \pm 0,02 \text{ M}$  lag, innerhalb von neun Stunden auf  $143 \pm 4 \text{ mM}$  reduziert (Abbildung 11).

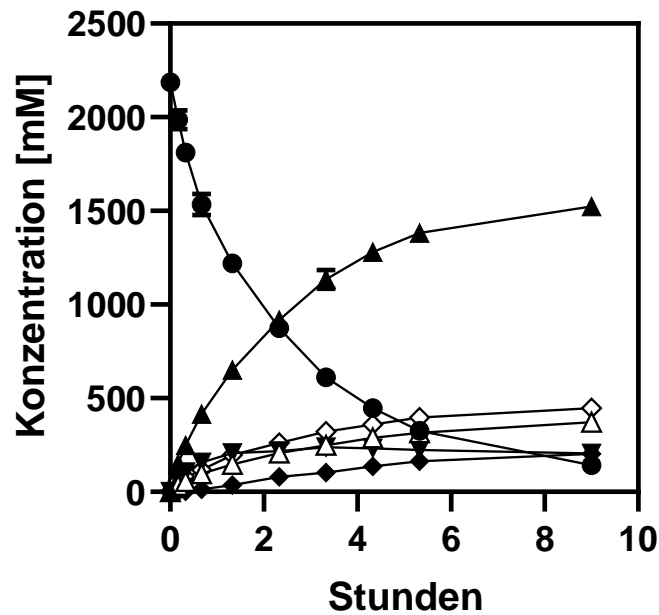


Abbildung 11: Quantitative Darstellung der Saccharose-Umsetzung durch LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417. Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* NEB5-alpha hergestellt und durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das Substrat Saccharose (●) sowie die Reaktionsprodukte Fruktose (△), Glukose (▲); DP3 (▼), DP4 (◆) und Levan (◇) wurden unter Verwendung der Trennsäule Aminex HPX-42A analysiert und mit Hilfe eines Brechungsindexdetektors quantifiziert. Polymeres Levan, welches im Zuge der Probenaufbereitung ausgefällt werden konnte, wurde durch saure Hydrolyse in monomere Einheiten zerlegt, sodass die Konzentration hier in Fruktose-Äquivalenten dargestellt ist. Das Experiment erfolgte als technisches Triplikat.

Im initialen Teil der Reaktion wies die Levansucrase eine spezifische Aktivität von  $2899 \text{ U mg}^{-1}$  auf, was dem zuvor bestimmten  $V_{\max}$  des rekombinanten Enzyms entsprach. Mit fortschreitendem Reaktionsverlauf konnte eine deutliche Viskositätserhöhung in den Reaktionsansätzen beobachtet werden, was auf die Produktion von polymerem Levan hindeutete. Die im Zuge der Probenvorbereitung durchgeführte ethanolische Fällung generierte ein weißes Präzipitat, dessen Menge mit zunehmender Inkubationszeit anstieg. Durch saure Hydrolyse des ausgefallenen Materials und anschließende HPLC-Analyse konnte der Levan-Gehalt in Form von Fruktose-Äquivalenten quantifiziert werden. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme konnte eine Levan-Konzentration von  $447 \pm 7 \text{ mM}$  (in Fruktose-Äquivalenten) bestimmt werden, was einem Ertrag von  $80,5 \pm 1,3 \text{ g L}^{-1}$  entsprach. Im beobachteten Reaktionszeitraum wurden die Monosaccharide Glukose und Fruktose in Konzentration von  $1,52 \pm 0,02 \text{ M}$  und  $372 \pm 9 \text{ mM}$  freigesetzt. Durch die hydrolytische Aktivität der Levansucrase, bei der die Fruktosyl-Einheit des Enzym-Fruktosyl-Intermediates auf Wasser übertragen wird, wurden 24,4 % der aus der Saccharose freigesetzten Fruktose-Einheiten in Form von freier Fruktose aus dem aktiven Zentrum entlassen. Neben dem Substrat Saccharose und den Produkten Glukose und Fruktose konnten unter Verwendung der Aminex Trennsäule HPX-42A weitere Reaktionsprodukte detektiert werden, bei denen es sich um ein Trisaccharid (DP3) und ein Tetrasaccharid (DP4) handelte. Basierend auf der in Abbildung 12 dargestellten Beobachtung, dass der Brechungsindex beziehungsweise die Peakfläche der analysierter Substanzen proportional zum Molekulargewicht zunimmt ( $R^2 = 0,9975$ ), konnten die Verbindungen ohne entsprechende Standards gemäß ihres Polymerisierungsgrades quantifiziert werden.

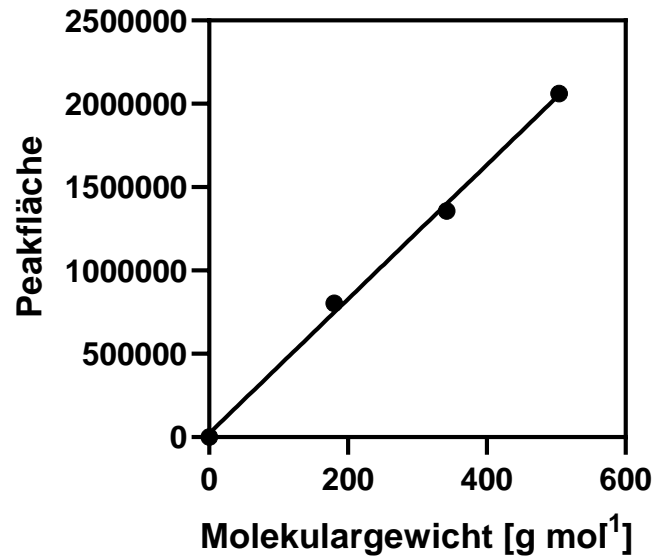


Abbildung 12: Linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Molekulargewicht von Zuckerstandards unter Verwendung der Aminex HPX-42-Trennsäule und des Shodex RI-101 Brechungsindexdetektors (ShowaDenko K.K.; Tokio, Japan). Analysiert wurden die Verbindungen Fruktose (180 g mol<sup>-1</sup>), Levanbiose (342 g mol<sup>-1</sup>) und Levantriose (504 g mol<sup>-1</sup>) in einer Konzentration von 5 mM und bei einer Flussrate von 0,6 ml min<sup>-1</sup>.

Die finale Konzentration des DP3-Reaktionsproduktes lag bei  $205 \pm 8$  mM, während eine Konzentration von  $204 \pm 19$  mM für das DP4-Produkt bestimmt werden konnte. Die chromatographische Analyse des *in-vitro*-Assays bestätigte die hohe katalytische Geschwindigkeit der rekombinanten Levansucrase und offenbarte zusätzlich, dass das Enzym in der Lage war, neben Levan relevante Mengen an FOS zu erzeugen. Insgesamt belief sich der Ertrag an Produkten, die einen  $DP \geq 3$  und  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktose-Einheiten aufwiesen, auf  $319,6 \pm 17,9$  g L<sup>-1</sup>.

### 3.3 Optimierung der Levan-Produktion durch *G. japonicus* LMG 1417

#### 3.3.1 Homologe Expression der Levansucrase LevS1417 in *G. japonicus* LMG 1417

##### 3.3.1.1 Konstruktion von *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417

Aufgrund der zahlreichen genetischen Tools, die für die Gattung *Gluconobacter* existieren (Kallnik et al. 2010; Kiefler et al. 2017; Peters et al. 2013), sollte untersucht werden, ob die untersuchte Levansucrase Plasmid-vermittelt in *G. japonicus* LMG 1417 überproduziert werden kann. Bevor eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen des Wildtyps *G. japonicus* LMG 1417 erfolgte, wurde daher zunächst die Überexpressionsmutante *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 erstellt. Diese Mutante, sollte durch eine homologe Produktion der zuvor charakterisierten Levansucrase LevS1417 eine schnellere Umsetzung der supplementierten Saccharose und somit höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielen. Als Basis für diese Mutante diente das Überexpressionsplasmid pBBR1-p264-streplong (Zeiser et al. 2014). Dieses Derivat des pBBR1MCS-2 Vektors (Kovach et al. 1995) wurde durch die Insertion der 5'-UTR des Gens *gox0264* aus *G. oxydans* 621H modifiziert, wodurch eine starke, konstitutive Expression von stromabwärts gelegenen, kodierenden Gensequenzen gewährleistet

wird (Kallnik et al. 2010). Durch die Insertion eines Vektor-Abschnitts des kommerziellen pASK-IBA3 Vektors, welcher die für das Strep-tag II kodierende Nukleotidsequenz und eine Transkriptions-terminationssequenz enthielt, wurde das finale Plasmid pBBR1-p264-streplong generiert.

Die für die Amplifizierung der Levansucrase-kodierenden Sequenz genutzten Oligonukleotide *levS1417\_EcoRV\_for* und *levS1417\_AscI\_rev* führten zur Integration einer stromaufwärtsgelegenen *EcoRV*-Schnittstelle und einer stromabwärtsgelegenen *AscI*-Schnittstelle. Durch einen Verdau der aufgereinigten PCR Amplifikate und des Zielvektors pBBR1-p264-streplong mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *AscI*, konnte in einer nachfolgenden Ligation das finale Konstrukt pBBR1\_p264\_levS1417 (Abbildung 13A) erzeugt werden. Die Klonierung erfolgte *off-frame* zum Vektor-kodierten Strep Tag II.

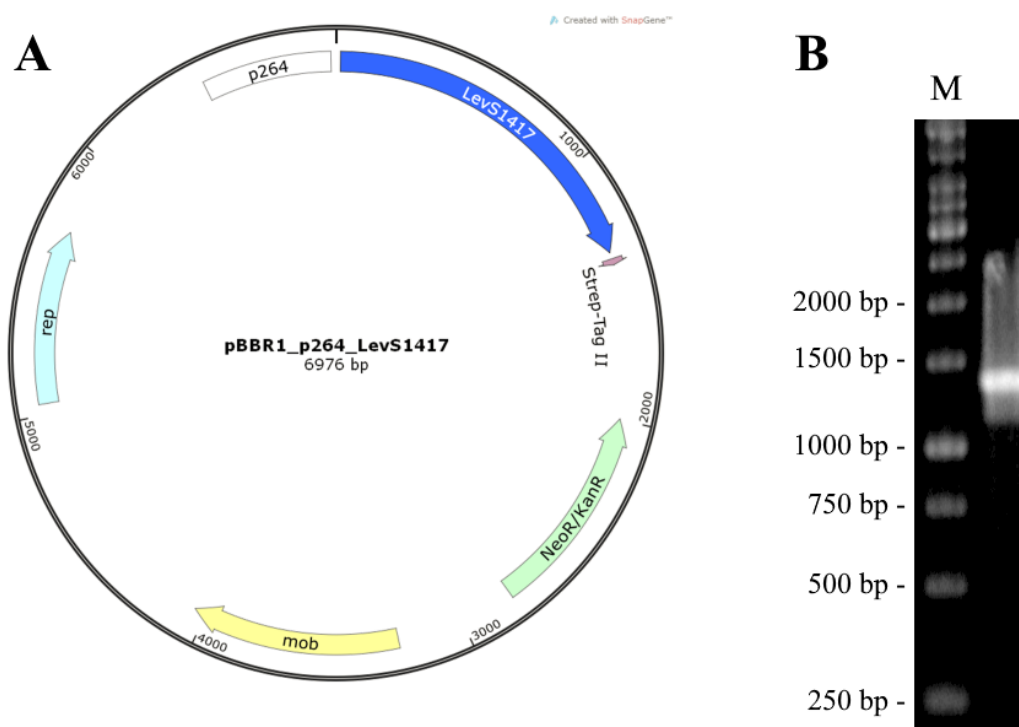


Abbildung 13: Plasmidkarte des Überexpressionsplasmids pBBR1\_p264\_levS1417 zur homologen Produktion der Levansucrase LevS1417 in *G. japonicus* LMG 1417 (A) und UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR (B) zur Verifizierung des Stammes *E. coli* NEB5-alpha pBBR1\_p264\_levS1417. Als Referenzmarker (M) wurde die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) eingesetzt.

Durch das Primerpaar *levS1417\_EcoRV\_for* und *levS1417\_AscI\_rev* wurde im Zuge der Kolonie-PCR ein Fragment erzeugt, welches der prognostizierten Größe von 1375 bp entsprach (Abbildung 13B) und die Klonierung damit bestätigt. Das generierte Plasmid wurde aus einer Über-Nacht-Kultur des verifizierten Transformanten aufgereinigt und durch das Elektroporationsprotokoll von Mostafa *et al.* in *G. japonicus* LMG 1417 eingebracht. (Mostafa et al. 2002). Die Aufnahme des Plasmids durch *G. japonicus* LMG 1417 wurde ebenfalls durch Kolonie-PCR bestätigt (nicht dargestellt).

### 3.3.1.2 Quantifizierung der Levansucrase-Aktivität in Zellfraktionen von *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417

Um den Effekt der Plasmid-vermittelten, homologen Überproduktion von LevS1417 zu validieren, wurden entsprechende Kulturen des Wildtyp- und Überexpressionsstammes in Überstands- und Zellfraktionen fraktioniert. Die relative Levansucrase-Aktivität der Fraktionen wurde photometrisch quantifiziert, indem die Freisetzung von Glukose-Einheiten während der Levansucrase-vermittelten Hydrolyse von Saccharose gemessen wurde. Im Überstand der Wildtyp-Kulturen wurde dabei eine volumetrische Levansucrase-Aktivität von  $6,9 \pm 0,2 \text{ U ml}^{-1}$  nachgewiesen, was  $62,8 \pm 1,4 \%$  der Gesamtaktivität entspricht (Abbildung 14). In der entsprechenden Zellfraktion wurde eine relative Levansucrase-Aktivität von  $4,1 \pm 0,7 \%$  gemessen. Die Plasmid-vermittelte Produktion von LevS1417 erhöhte die volumetrische Levansucrase-Aktivität der Überstandsfraktion auf  $15,3 \pm 2,2 \text{ U ml}^{-1}$ . Somit war die im Überstand des Überexpressionsstammes gemessene Levansucrase-Aktivität 2,2-mal höher als die im Wildtyp-Überstand detektierte Aktivität. In der Zellfraktion des modifizierten Stammes wurde eine relative Aktivität von  $6,2 \pm 0,4 \%$  nachgewiesen.

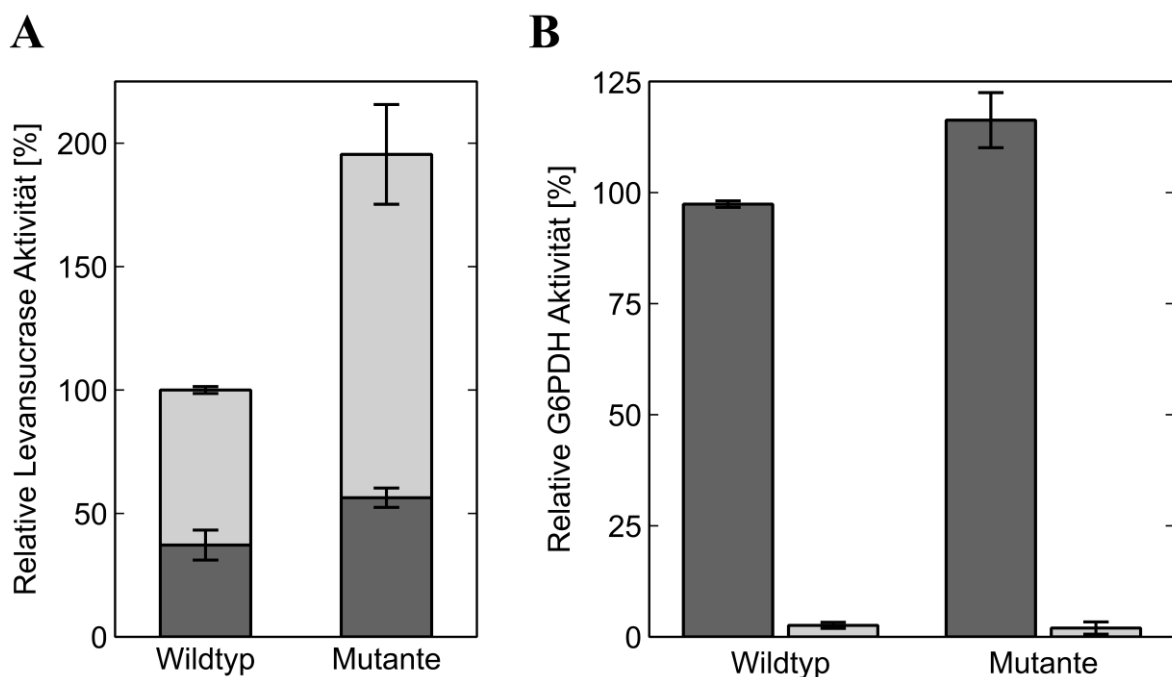


Abbildung 14: Photometrische Quantifizierung der relativen Levansucrase- und G6PDH-Aktivität in fraktionierten Kulturen von *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten in der Zell-Fraktion (■) und der Überstandsfraktion (□). 100 % der relativen Levansucrase-Aktivität entsprechen den summierten Levansucrase-Aktivitäten, die in den Fraktionen des Wildtyp-Stammes detektiert wurden. 100 % der relativen G6PDH-Aktivität entsprechen den summierten G6PDH-Aktivitäten, die in den Fraktionen des Wildtyp-Stammes detektiert wurden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass relevante Teile der Levansucrase von lysierten Zellen freigesetzt wurden, wurde die Aktivität der intrazellulären Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) in den präparierten Fraktionen quantifiziert. Weniger als 3 % der gesamten G6PDH-Aktivität

wurde in den untersuchten Überstandsfractionen nachgewiesen, was auf keine relevante Lyse der Zellen hindeutete.

### 3.3.2 *G. japonicus* LMG 1417 vs. *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417: Batch-Kultivierung

Wie die Literatur zeigt, tolerieren Vertreter der Gattung *Gluconobacter* sehr hohe Osmolaritäten und eignen sich daher besonders für biotechnologische Applikationen. *G. oxydans* 621H konnte beispielsweise erfolgreich bei einer initialen Glukose-Konzentration von 1 M kultiviert werden (Zahid & Deppenmeier 2016). Um die Osmo-Toleranz und das Wachstumsverhalten des Wildtyp-Stamms *G. japonicus* LMG 1417 gegenüber dem erstellten Überexpressionsstamm *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 zu validieren, erfolgten Batch-Kultivierungen in Medien mit stark erhöhten Saccharose-Konzentrationen. Die chromatographische Analyse der Kulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierungen ließ eine deutlich schnellere Saccharose-Umsetzung durch den Überexpressionsstamm erkennen (Abbildung 15).

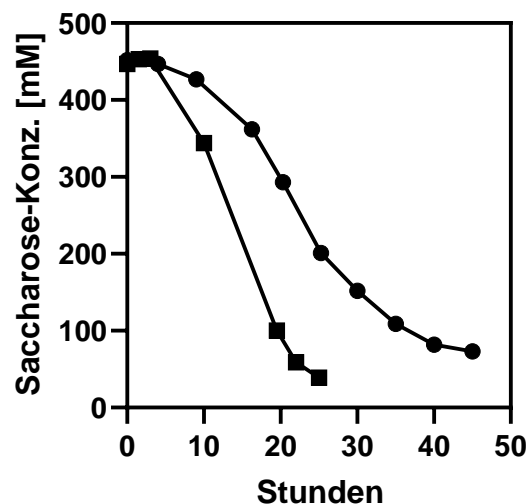


Abbildung 15: Vergleich der Saccharose-Umsetzung durch *G. japonicus* LMG 1417 (●) und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 (■). Für die Batch-Kulturen wurde das modifizierte Medium Nr. 13 V2.0 (Tabelle 24) mit einer initialen Saccharose-Konzentrationen von 450 mM eingesetzt. Zur Pufferung wurde MES (pH 6.9) in einer Endkonzentration von 100 mM supplementiert. Die Kultivierung erfolgte im 250 ml Maßstab in 2 L Schikanekolben bei 28 °C und 180 rpm. Die Saccharose-Konzentration wurde mittels HPLC unter Verwendung der Aminex HPX-87H Trennsäule und eines RI-Detektors quantifiziert.

Dadurch konnten die Ergebnisse der photometrisch quantifizierten Levansucrase-Aktivitäten untermauert werden (Abbildung 14). Während der Wildtyp 45 Stunden benötigte, um 83,8 % der zugefügten Saccharose ( $\hat{=}$  379 mM) umzusetzen, wurden durch den Überexpressionsstamm 86,8 % des Substrates ( $\hat{=}$  388 mM) in 22 Stunden konvertiert. Die Saccharose wurde somit mit Umsatzraten von  $2,88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Wildtyp) bzw.  $6,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Überexpressionsstamm) umgesetzt, wodurch erneut die gesteigerte Produktivität durch die Plasmid-vermittelte homologe Produktion von LevS1417 verdeutlicht wurde. Beide Kulturen zeigten mit fortschreitender Inkubationszeit eine starke Zunahme der Viskosität, was auf die Produktion des Fruktan-Polymers Levan hindeutete. Um die Grenzen der Osmotoleranz für

den Überexpressionsstamm auszutesten, wurde die in Abbildung 15 dargestellte Batch-Kultivierung mit gesteigerten Substratkonzentrationen wiederholt. Die Konzentration der Saccharose in den verwendeten Medien wurde dafür auf 800 mM bzw. 1200 mM erhöht (Abbildung 16).

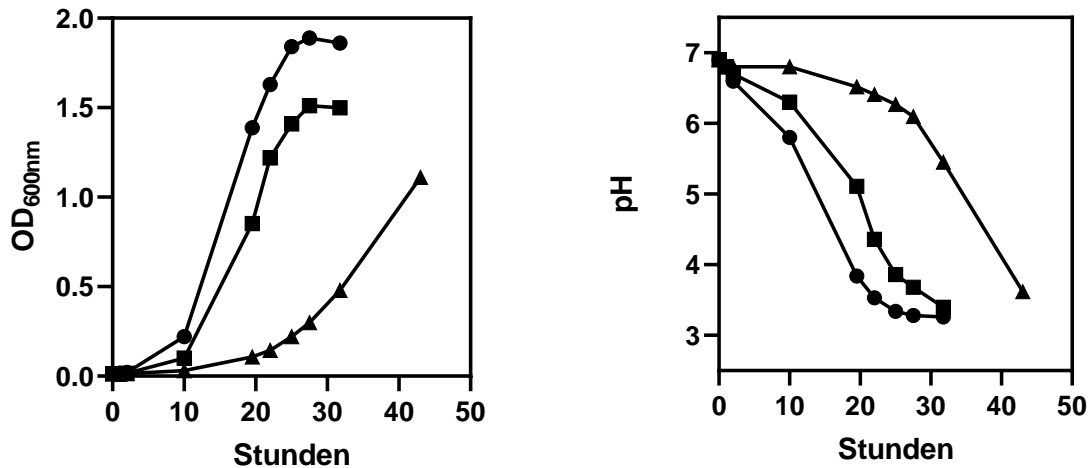


Abbildung 16: Wachstumsverhalten von *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 bei stark erhöhten Substratkonzentrationen. Für die Batch-Kulturen wurde das modifizierte Medium Nr. 13 V2.0 (Tabelle 24) mit Saccharose-Konzentrationen von 450 mM (●), 800 mM (■) und 1200 mM (▲) eingesetzt. Zur Pufferung wurde MES (pH 6.9) in einer Endkonzentration von 100 mM supplementiert. Die Kultivierung erfolgte im 250 ml Maßstab in 2 L Schikanekolben. Neben der OD<sub>600nm</sub> wurde zusätzlich die Veränderung des pH-Wertes verfolgt.

Der erstellte Stamm *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 zeigte in der beobachteten Versuchsreihe eine sehr hohe Toleranz gegenüber stark erhöhten Osmolaritäten. Ausgehend von einer initialen Saccharose-Konzentration von 450 mM erreichte der Organismus innerhalb von 28 Stunden eine End-OD<sub>600nm</sub> von 1,89. Der pH der entsprechenden Kultur sank in diesem Zeitraum auf 3,3. Durch Erhöhung der Saccharose-Konzentration auf 800 mM zeigte sich eine verlängerte Lag-Phase der entsprechenden Kultur sowie eine Verringerung der End-OD<sub>600nm</sub> auf 1,5. Der pH-Wert der Kultur sank innerhalb von 32 Stunden auf ein vergleichbar niedriges Niveau von 3,4. Für die höchste Saccharose-Konzentration (1,2 M) konnte eine deutliche Verlängerung der Lag-Phase beobachtet werden. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme lag die OD<sub>600nm</sub> bei 1,11 und der pH bei 3,6. Alle durchgeführten Kulturen zeigten in der mittleren Inkubationsphase erneut eine starke Viskositäts-erhöhung des Mediums. In der späten Inkubationsphase nahm die Viskosität wieder ab, was auf einen enzymatischen Abbau des potenziell gebildeten Levans hindeutete.

Aufgrund des rapiden Abfalls des pH-Wertes in den durchgeführten Batch-Kultivierungen wurde in einem nachfolgenden Experiment die Konzentration des verwendeten MES-Puffers auf 200 mM verdoppelt. Die Erhöhung der Puffer-Konzentration wirkte sich zwar positiv auf die erreichten OD<sub>600</sub>-Werte, jedoch negativ auf die Kultivierungszeit aus (Abbildung 17). Bei einer eingesetzten Saccharose-Konzentration von 450 mM erreichte der kultivierte Überexpressionsstamm durch die angepasste Pufferung nach 32 Stunden eine End-OD<sub>600nm</sub> von 2,1. Der pH-Wert der entsprechenden Kultur lag zu diesem Zeitpunkt bei 4,1, sank im weiteren Verlauf der Kultivierung aber weiter auf 3,4.

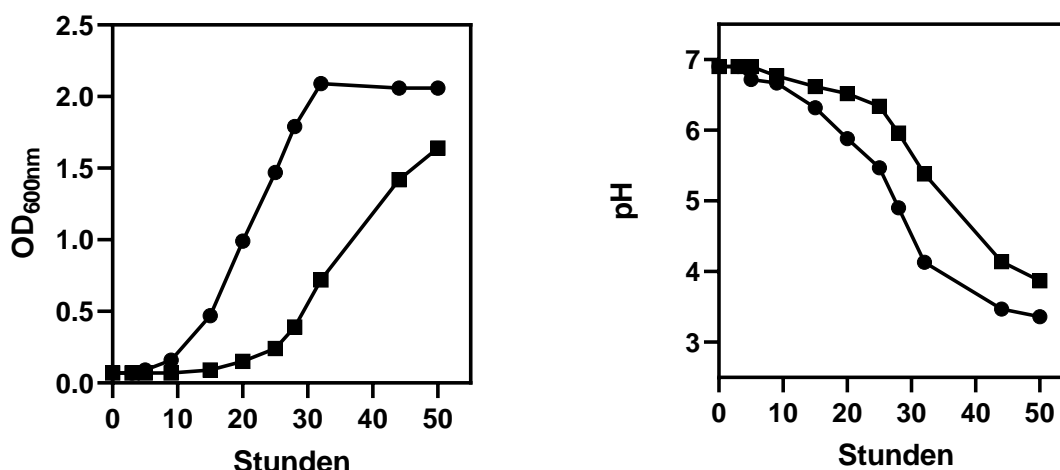


Abbildung 17: Wachstumsverhalten von *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 bei erhöhten Substratkonzentrationen und angepasster Pufferung. Für die Kultivierung wurde das modifizierte Medium Nr. 13 V2.0 (Tabelle 24) mit Saccharose-Konzentrationen von 450 mM (●) und 800 mM (■) eingesetzt. Zur Pufferung wurde MES (pH 6.9) in einer Endkonzentration von 200 mM supplementiert. Die Kultivierung erfolgte im 250 ml Maßstab in 2 L Schikanekolben. Neben der OD<sub>600nm</sub> wurde zusätzlich die Veränderung des pH-Wertes verfolgt.

Unter Verwendung von 800 mM Saccharose zeigte sich eine starke Verlängerung der Lag-Phase. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme konnte eine OD<sub>600nm</sub> von 1,64 und ein pH-Wert von 3,87 bestimmt werden. Eine dritte Kultur, der wie zuvor (Abbildung 16) eine Saccharose-Konzentration von 1,2 M zugesetzt wurde, zeigte kein Wachstum (nicht dargestellt). Bei allen durchgeführten Kultivierungen konnte eine starke Zunahme der Viskosität in der frühen und mittleren Inkubationsphase beobachtet werden, was auf die Produktion des  $\beta$ -2,6-glykosidischen Fruktan-Polymers Levan hindeutete. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm diese Viskosität jedoch wieder ab, was einen potenziellen enzymatischen Abbau des Polymers vermuten lässt.

### 3.3.3 Charakterisierung der potenziellen Levanase aus *G. japonicus* LMG 1417

Die Abnahme der Kulturviskosität bei verlängerter Inkubation deutete auf eine enzymatische Levan-Hydrolyse durch *G. japonicus* LMG 1417 hin. Es wurde daher eine bioinformatische Analyse durchgeführt, um Gene im Genom des Essigsäurebakteriums zu identifizieren, die für potenzielle Levan-hydrolysierende Enzyme kodieren. Es wurde vermutet, dass die Deletion entsprechender Gene die beobachtete Levan-Hydrolyse minimieren und somit die Ausbeute an polymerem Levan erhöhen könnte.

Durch bioinformatische Recherchen konnte ein Gen im Genom von *G. japonicus* LMG 1417 identifiziert werden, das für ein als Levanase annotiertes Protein kodiert (GenBank-Eintrag: KXV26505.1.). Das Vorhandensein eines N-terminalen TAT-Signalpeptids deutete darauf hin, dass es sich bei dem Protein um ein extrazelluläres Protein handelt, das am Abbau von Levan beteiligt sein könnte.



### 3.3.3.1 Produktion und Aufreinigung der potenziellen Levanase

Um die Funktion der potenziellen Levanase zu untersuchen, wurde die für das Protein kodierende Nukleotid-Sequenz in einen pASK-IBA5 Überexpressionsvektor kloniert. Im Zuge der Amplifizierung wurde durch die verwendeten Oligonukleotid-Primer *levB\_LMG1417\_oSP\_f* und *levB\_LMG1417\_oSP\_r* stromaufwärts des kodierenden Bereichs eine *SacII* und stromabwärts eine *HindIII*-Schnittstelle eingebracht. Durch einen Verdau der aufgereinigten Amplifikate und des Vektors pASK-IBA5 mit den Restriktionsendonukleasen *SacII* und *HindIII* konnte in einer nachfolgenden Ligation das finale Plasmid pASK5\_lev1417 konstruiert werden (Abbildung 18A). Die Aufnahme des Konstrukts durch *E. coli* NEB5-alpha wurde im Anschluss an die durchgeführte Hitzeschocktransformation mittels Kolonie-PCR verifiziert. Im Anschluss an die Kolonie-PCR, für die das Primerpaar *levB\_LMG1417\_oSP\_f* und *levB\_LMG1417\_oSP\_r* eingesetzt wurde, konnte im UV-Durchlicht ein Fragment visualisiert werden, welches der prognostizierten Größe von 1870 bp entsprach (Abbildung 18B).

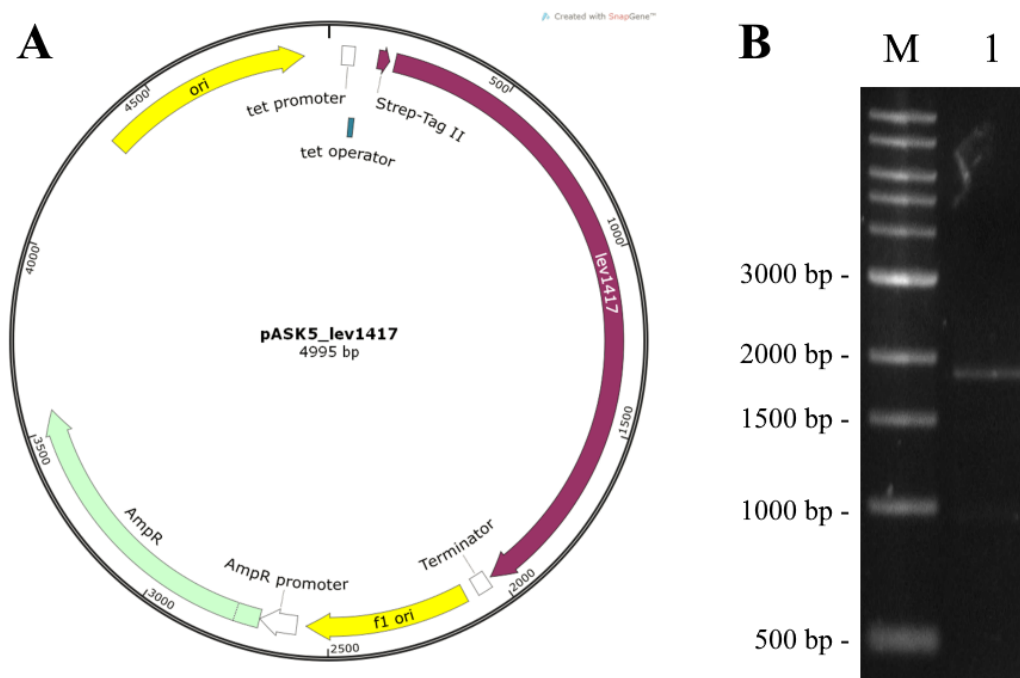


Abbildung 18: Plasmidkarte des Überexpressionsplasmids pASK5\_lev1417 zur heterologen Produktion der potenziellen Levanase Lev1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 in *E. coli* NEB5-alpha (A) und UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR (B) zur Verifizierung des Stammes *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_lev1417. Als Referenzmarker wurde die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

Die potenzielle Levanase wurde heterolog mit Hilfe des generierten Stammes *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_lev1417 produziert und anschließend mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aus dem Zellextrakt aufgereinigt. Die im Anschluss durchgeführte Proteinquantifizierung der Elutionsfraktionen via Bradford-Test bestätigte die Produktion und Aufreinigung Strep-Tag-gekoppelter Proteine. Ausgehend von einem Liter *E. coli* Kultur wurde eine Gesamt-Proteinausbeute von 2,7 mg in den Eluate bestimmt. Durch elektrophoretische Auftrennung der Eluate mittels SDS-PAGE und

anschließende Färbung der SDS-Gele konnte die potenzielle Levanase sichtbar gemacht werden. Sowohl durch Silberfärbung als auch durch die Immunodetektion wurde eine etwa 70 kDa große Bande angefärbt. Neben dem rekombinanten Protein, das ein prognostiziertes Molekulargewicht von 68,7 kDa aufwies, wurden keine Verunreinigungen detektiert.

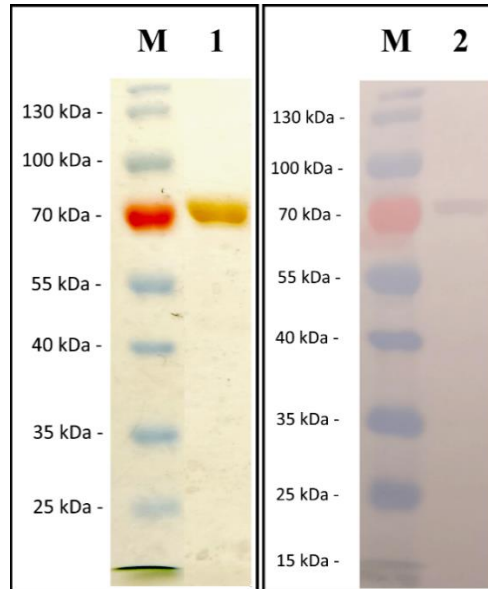


Abbildung 19: Visualisierung der durch *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_lev1417 produzierten und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigten potenziellen Levanase Lev1417. Die rekonstruierte Levanase, deren prognostiziertes Molekulargewicht bei 68,7 kDa liegt, wurde mittels Silberfärbung (1) und Western Blotting (2) visualisiert. Als Referenzstandard (M) diente die PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

### 3.3.3.2 Charakterisierung der potenziellen Levanase aus *G. japonicus* LMG 1417

Um die Funktion der potenziellen Levanase aus *G. japonicus* LMG 1417 zu validieren, wurde das rekombinante Enzym für die Hydrolyse von kommerziellem Levan eingesetzt, welches von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen und mit Hilfe von *E. herbicola* produziert wurde (Blake et al. 1982). Dafür wurde eine 100 mM Levan-Lösung mit 10 µg des aufgereinigten Enzyms bei 30 °C inkubiert. Eine HPLC-Analyse des Fällungsüberstandes sollte nach 3-stündiger Inkubation einen Nachweis für die Freisetzung von Fruktose oder Fruktooligosacchariden liefern. Tatsächlich konnten im Überstand keine Produkte nachgewiesen werden, die auf eine hydrolytische Aktivität der potenziellen Levanase hindeuteten. Auch beim Einsatz von Inulin, einem Fruktan das überwiegend aus  $\beta$ -2,1-glykosidisch verknüpften Fruktose-Einheiten besteht, konnte keine enzymatische Hydrolyse beobachtet werden. Durch BlastP-Analysen gegen die UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank konnte die enzymatische Funktion des untersuchten Proteins nicht identifiziert werden. Grundsätzlich zeichnet sich diese Datenbank dadurch aus, dass die Funktion der in der Datenbank hinterlegten Proteine durch experimentelle Nachweise bestätigt wurde, was eine zuverlässige Zuweisung von Enzym-Funktionen ermöglicht. Die bei den Analysen aufgedeckten Referenz-Proteine zeigten jedoch verhältnismäßig geringe Sequenzübereinstimmungen (< 35 %) zur potenziellen Levanase, weshalb weitere blastp-Analysen gegen die „non-redundant“-Datenbank durchgeführt wurden. Diese Analysen, denen

Computer-basierte, automatisierte Annotationen zugrunde lagen, zeigten hohe Sequenz-übereinstimmungen (> 90 %) zu Enzymen der Glykosid-Hydrolase Familie 32 aus Vertretern der Gattung *Gluconobacter*. Enzyme dieser Familie können die Hydrolyse von Saccharose, aber auch von Oligo- und Polyfruktofen katalysieren. Um die Zuordnung zur GH32-Familie zu bestätigen, erfolgte ein Hydrolyse-Assays, für den das untersuchte Enzym aus *G. japonicus* LMG 1417 zusammen mit Saccharose inkubiert wurde. Der photometrische Assay, der auf dem in Abbildung 3 dargestellten Glukose-Nachweis beruht, zeigte, dass das gereinigte Enzym die Hydrolyse von Saccharose katalysiert (Abbildung 20). Nach Zugabe der potenziellen Levanase konnte photometrisch eine deutliche Zunahme der Absorption bei 340 nm beobachtet werden, was auf die Reduktion von NADPH und somit eine enzymatische Freisetzung von Glukose aus Saccharose hindeutete. Durch die Verdopplung bzw. Vervierfachung der im Ansatz befindlichen Eluat-Menge und eine Quantifizierung der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit [ $\Delta E \text{ min}^{-1}$ ] konnte bestätigt werden, dass die Hilfsenzyme die Geschwindigkeit der Reaktion nicht limitierten (nicht dargestellt).

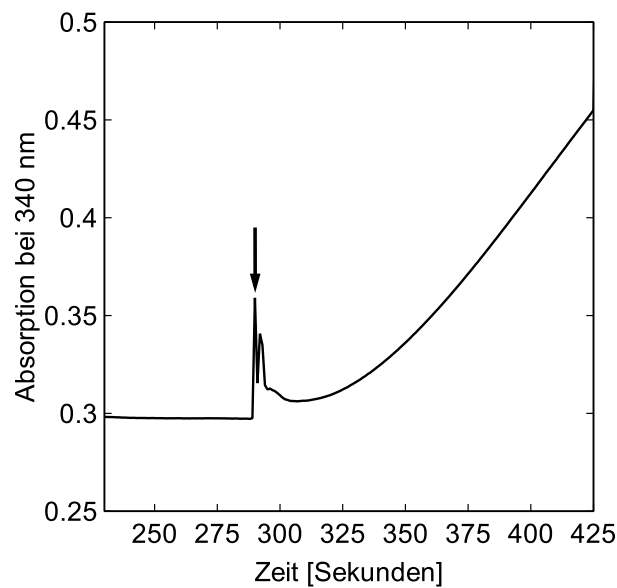


Abbildung 20: Photometrischer Aktivitätsnachweis der potenziellen Levanase aus *G. japonicus* LMG 1417. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch den in Abbildung 3 dargestellten enzymatischen Glukose-Nachweis. Vor Initiation der Reaktion wurden die Komponenten  $\text{H}_2\text{O}$ , KP-Puffer pH 7,1, ATP, NADP und Saccharose sowie die Hilfsenzyme Hexokinase und Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase vereint und bis zur Ausbildung einer stabilen Basislinie bei 30 °C inkubiert. Die Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  des gereinigten Enzyms aus Kapitel 3.3.3.1 Produktion und Aufreinigung der potenziellen Levanase startete die enzymatische Reaktion (Pfeil). Die Messung erfolgte bei 340 nm in einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco GmbH; Pfungstadt, Deutschland).

Folglich konnte über den Extinktionskoeffizienten von NADPH ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und die bekannte Proteinkonzentration der verwendeten Elutionsfraktion die spezifische Aktivität des unbekanntes Enzyms bestimmt werden. Basierend auf der in Abbildung 20 dargestellten photometrischen Aktivitätsbestimmung hydrolysierte das folglich als Invertase klassifizierte Enzym Saccharose mit einer spezifischen Aktivität von  $21,5 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$ . Da der photometrische Assay lediglich den Nachweis von freigesetzten Glukose-Einheiten, aber keine Aussage über eine etwaige

Transfruktosylierungsreaktion ermöglicht, wurden die Reaktionsprodukte der Invertase chromatographisch mit Hilfe der Aminex HPX-87 H Trennsäule analysiert. Die Auswertung der HPLC-Analysen belegte, dass die untersuchte Invertase unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ausschließlich hydrolytisch auf das Substrat Saccharose wirkte (Abbildung 21).

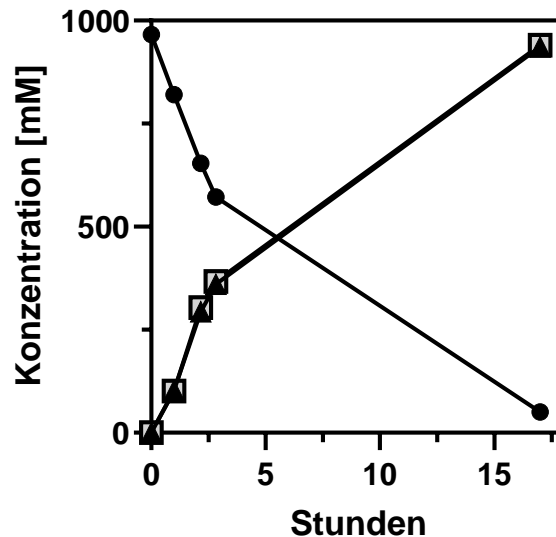


Abbildung 21: Reaktionskinetik der rekombinanten Invertase aus *G. japonicus* LMG 1417. Das Protein wurde heterolog in *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_lev1417 produziert und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dargestellt sind der Konzentrationsverlauf des Substrates Saccharose (●), sowie der Produkte Glukose (□) und Fruktose (▲). Für die abgebildete Reaktion wurde eine 1 M Saccharose-Lösung durch Zugabe von 50  $\mu$ l 10X McIlvaine Puffer auf pH 6 eingestellt, mit 79,5  $\mu$ g der rekombinanten Invertase versetzt und bei 30 °C inkubiert.

Im Reaktionsverlauf wurden Glukose und Fruktose in äquimolaren Konzentrationen detektiert, was auf keine Transfruktosylierungsreaktion hindeuten lies. Über die Abnahme der Saccharose-Konzentration in der frühen Phase der Reaktion konnte erneut die spezifische Aktivität des Enzyms bestimmt werden. Auf Basis der chromatographischen Daten wurde für die Invertase eine spezifische Aktivität von 29,3 U  $\text{mg}^{-1}$  ermittelt. Damit lag der chromatographisch bestimmte Aktivitätswert in einer vergleichbaren Größenordnung wie die photometrisch quantifizierte spezifische Aktivität. Da im Zuge der Kultivierungen von *G. japonicus* LMG 1417 keine signifikante Freisetzung von Fruktose-Einheiten beobachtet werden konnte und die aufgereinigte Invertase keine hydrolytische Aktivität auf das Fruktan Levan zeigte, wurde keine Deletion des entsprechenden Nukleotid-Bereichs im Genom des untersuchten Stammes vorgenommen. Die Fähigkeit der Invertase, hohe Konzentrationen von Saccharose in kurzer Zeit zu hydrolysieren, wurde sich abseits dieser Arbeit im 5-Ketofruktose-Produktionsprozess zu Nutze gemacht (Hoffmann et al. 2020). In diesem Verfahren katalysiert die Invertase die Spaltung des Substrates Saccharose in die monomeren Untereinheiten Glukose und Fruktose. Die freigesetzte Fruktose wird dann durch modifizierte *Gluconobacter* Stämme zum vielversprechenden Süßstoff 5-Ketofruktose oxidiert. Die Oxidation von Fruktose zu 5-Ketofruktose wird dabei durch den Membran-gebundenen Fruktose-Dehydrogenase-Komplex katalysiert. Da die Problematik der Viskositätsabnahme im späten Kultivierungsverlauf von *G. japonicus* LMG 1417 nicht aufgeklärt

werden konnte, wurde der Fokus auf eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen gelegt, um die Levan-Ausbeute zu maximieren, die bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase generiert werden kann.

### 3.3.4 Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 und dem erstellten Überexpressionsstamm

Wie die in Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellten Wachstumsversuche im Batch-Verfahren zeigten, stellte das auf MES basierende Puffersystem kein adäquates Mittel dar, um die im Zuge des oxidativen Stoffwechsels von *Gluconobacter* entstehenden Säuren gegenzupuffern. Die Optimierung der Kultivierung und vor allem ein effektiver pH-Ausgleich bargen somit großes Potenzial für eine Maximierung der Biomasse und der damit verbundenen Raum-Zeit-Ausbeuten. Da eine Erhöhung der Pufferkonzentration negative Auswirkungen auf die Kultivierungszeit hatte (Abbildung 17) und zusätzliche Prozesskosten verursacht, wurden die beiden Stämme *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 in Klein-Fermentern mit automatischer pH-Regulation kultiviert. Dabei wurde die Titrations-Einheit so eingestellt, dass ab einem pH-Wert von 5,1 durch die Zugabe einer 1M NaOH-Lösung ein konstantes pH-Niveau gewährleistet wurde. Die Fermentation erfolgte mit einer initialen Saccharose-Konzentration von 1,2 M und wurde durch 1 %-ige Inokulation mit entsprechenden Vorkulturen gestartet. Der Wildtyp-Stamm zeigte innerhalb der ersten 22 Stunden Inkubation ein langsames, aber kontinuierliches Wachstum (Abbildung 22).

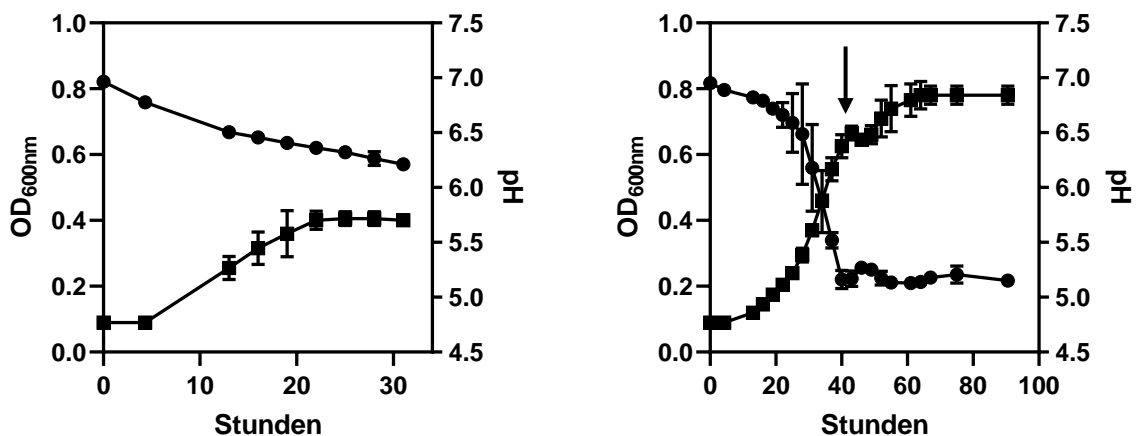


Abbildung 22: Wachstumsverhalten von *G. japonicus* LMG 1417 (links) und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 (rechts) im Klein-Fermenter. Für die Kultivierung wurde das modifizierte Medium Nr. 13 V2.0 (Tabelle 24) mit einer Saccharose-Konzentrationen 1,2 M eingesetzt. Zur initialen Pufferung wurde MES (pH 6.9) in einer Endkonzentration von 100 mM supplementiert. Die Kultivierung erfolgte in einem DASGIP® Bioreaktorsystem (Jülich, Deutschland) bei automatisierter pH-Titration und druckgesteuerter Sauerstoff-Zufuhr in einem Volumen von 600 ml. Das mittels Heizmanschette auf 30 °C temperierte Glas-Gefäß wurde durch einen Druckluft-Fluss von 40 L/min mit Raumluft belüftet. Neben der OD<sub>600nm</sub> (■) wurde der pH (●) der Fermenterlösung diskontinuierlich bestimmt. Der Pfeil indiziert den Zeitpunkt der Saccharose-Zugabe. Das Experiment erfolgte als biologisches Duplikat.

Aufgrund des danach stagnierenden Wachstums und des Ausbleibens einer Viskositäts-erhöhung des Kulturmediums wurde die Fermentation des Wildtyps nach 31 Stunden abgebrochen. Zum Zeitpunkt

der letzten Probennahme lag die  $OD_{600nm}$  bei 0,4 und der pH-Wert der Kultur bei  $6,21 \pm 0,1$ . Im Vergleich zum Wildtyp zeigte der Überexpressionsstamm ein stärkeres Wachstum und eine deutlich stärkere Ansäuerung des Mediums. Innerhalb von 40 Stunden wurde der pH-Wert der Kultur von  $6,9 \pm 0,1$  auf  $5,2 \pm 0,1$  abgesenkt, wodurch das automatische Titrationssystem zur Regulation des pH-Wertes aktiviert wurde. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine  $OD_{600nm}$  von  $0,63 \pm 0,04$  nachgewiesen werden. Aufgrund der schnellen Abnahme der Saccharose-Konzentration erfolgte nach 43 h die Zugabe zusätzlicher Saccharose, wodurch der Saccharose-Gehalt der Kultur von  $825 \pm 16$  mM auf  $1155 \pm 48,8$  mM angehoben wurde (Abbildung 23).

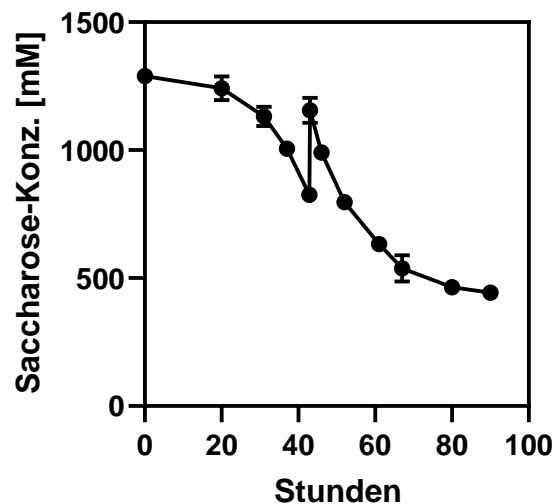


Abbildung 23: Saccharose-Verbrauch während der Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417. Die Quantifizierung erfolgte durch HPLC-Analysen des Kulturüberstandes.

Im weiteren Kultivierungsverlauf blieb der pH auf einem konstanten Niveau, während die  $OD_{600nm}$  auf einen finalen Wert von  $0,78 \pm 0,03$  anstieg. Innerhalb der 90-stündigen Inkubation konnte die Saccharose-Konzentration auf einen Gehalt von  $412 \pm 71$  mM reduziert werden. Eine deutlich sichtbare Erhöhung der Medienviskosität deutete auf die Produktion des  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktan-Polymers Levan hin. Mittels ethanolischer Fällung konnte aus dem Kulturüberstand ein weißes Präzipitat gewonnen werden, welches durch saure Hydrolyse in die Monosaccharid-Bausteine Fruktose umgesetzt wurde. Durch chromatographische Quantifizierung der generierten Fruktose-Einheiten konnte ein finaler Levan-Gehalt von  $109 \text{ g L}^{-1}$  ermittelt werden.

### 3.3.5 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417

Die Kultivierung von *G. japonicus* LMG 1417 im Klein-Fermenter zeigte, dass sich die pH-Problematik der Batch-Kultivierungen (Abbildung 17) durch ein automatisiertes Titrationssystem beheben lies. Die durchgeführte Fermentation offenbarte jedoch auch, dass die extreme Viskositätszunahme des Mediums im Zuge der Levan-Produktion eine Probenaufbereitung und vor allem das Abtrennen von Zellen aus dem Kulturmedium enorm erschwerte. Die photometrische Bestimmung der relativen Levansucrase-

Aktivität in verschiedenen Zellkompartimenten (Abbildung 14) zeigte, dass *G. japonicus* LMG 1417 und der generierte Überproduktionsstamm große Teile der Levansucrase LevS1417 in den extrazellulären Raum sezernieren. Aufbauend auf dieser Beobachtung wurde ein Zell-freies System zur Produktion von Levan entwickelt, für das der Überstand entsprechender Kulturen eingesetzt wurde. Acht ml einer gepufferten 2,24 M Saccharose-Lösung wurden zu diesem Zweck mit zwei ml Kulturüberstand versetzt, bei 30 °C inkubiert und der Verlauf der Substrat- und Produktkonzentrationen mittels HPLC verfolgt.

### 3.3.5.1 Zell-freie Levan-Produktion auf Basis von *G. japonicus* LMG 1417

Unter Verwendung des Wildtyp-Überstandes konnten 90 % der supplementierten Saccharose (1,8 M) innerhalb von 480 Stunden umgesetzt werden (Abbildung 24). Levan wurde als primäres Fruktose-assoziiertes Produkt mit einer Endkonzentration von  $877 \pm 42$  mM (ausgedrückt in Fruktose-Äquivalenten) nachgewiesen, was einer Ausbeute von  $157,9 \pm 7,6$  g L<sup>-1</sup> entsprach. Die katalytische Aktivität der Levansucrase führte ebenfalls zur Akkumulation verschiedener Fruktooligosaccharide. Identifiziert wurden die Verbindungen 6-Kestose, 6-Nystose und 1-Kestose mit Ausbeuten von  $44,8 \pm 0,5$  g L<sup>-1</sup>,  $31,9 \pm 1,8$  g L<sup>-1</sup> bzw.  $16,1 \pm 0,3$  g L<sup>-1</sup>. Weitere FOS mit einem DP von 4-6 wurden in geringen Mengen gefunden, konnten aber nicht den verfügbaren Standards zugeordnet werden. Die nicht identifizierten FOS konnten aufgrund des zuweisbaren Polymerisierungsgrades in Monosaccharid-Äquivalenten quantifiziert werden. Ihre Gesamtkonzentration belief sich  $50,4 \pm 4,5$  g L<sup>-1</sup>. Abgesehen von Saccharose, deren Konzentration innerhalb der Reaktionszeit auf  $71,6$  g L<sup>-1</sup> reduziert wurde, wurden mittels HPLC keine weiteren Disaccharide nachgewiesen

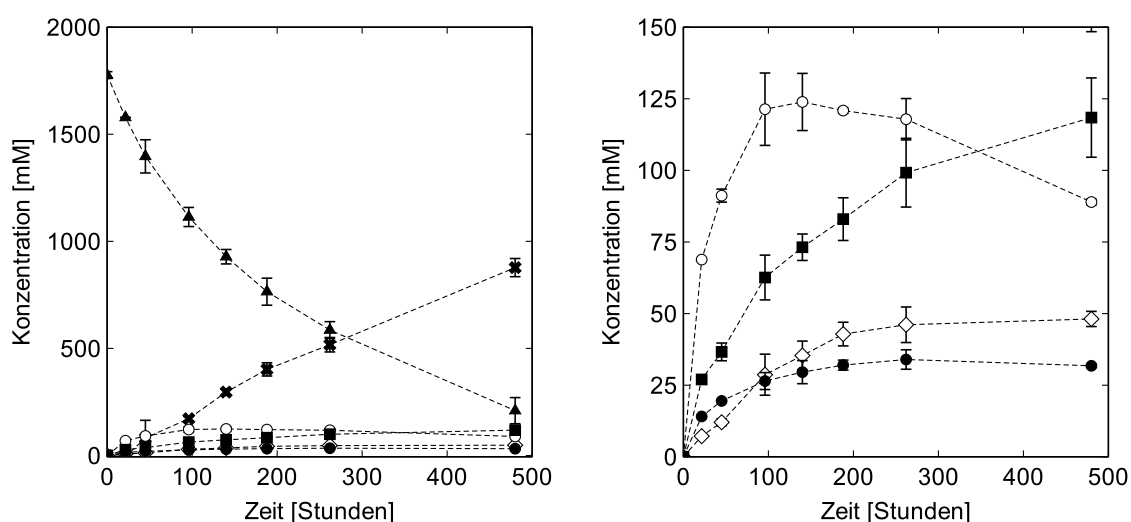


Abbildung 24: Reaktionskinetik der zellfreien Levanproduktion basierend auf dem Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417. Zusätzlich zur Gesamtkinetik (A) wird eine vereinfachte Darstellung der niedrig konzentrierten Fruktooligosaccharide mit angepasster Y-Achse gezeigt (B). Die Fruktose-assoziierten Zucker Saccharose (▲), Fruktose (■), Levan (x), 6-Kestose (○), 1-Kestose (●) und 6-Nystose (◇) wurden in einer Konzentration von mindestens 10 mM mittels HPLC nachgewiesen. Die Levan-Konzentration wird in Fruktose-Äquivalenten ausgedrückt. Das Experiment wurde als Triplikat durchgeführt

Nach 480 Stunden Inkubation wurde eine Fruktose-Konzentration von  $21,3 \pm 2,5 \text{ g L}^{-1}$  detektiert, was einem Anteil von 7,6 % der Fruktose-Einheiten entsprach, die durch die katalytische Aktivität der Levansucrase aus Saccharose freigesetzt wurden.

### 3.3.5.2 Zell-freie Levan-Produktion auf Basis von *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417

Die Eignung des generierten Überexpressionsstammes für die zellfreie Levan-Produktion wurde analog zu den Experimenten des Wildtyp-Überstandes untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der photometrischen Aktivitätsmessungen (Abbildung 14) produzierte der Überexpressionsstamm erhöhte Mengen der Levansucrase LevS1417, was zu einer schnelleren Umsetzung des Substrats während der zellfreien Levanproduktion führte (Abbildung 25). 86 % der supplementierten Saccharose wurden innerhalb von 260 Stunden umgewandelt. Erneut wurde Levan als primäres Fruktose-assoziiertes Produkt mit einer Endkonzentration von  $824,4 \pm 72 \text{ mM}$  (ausgedrückt in Fruktose-Äquivalenten) detektiert, was einer Ausbeute von  $148,5 \pm 12,9 \text{ g L}^{-1}$  entsprach.

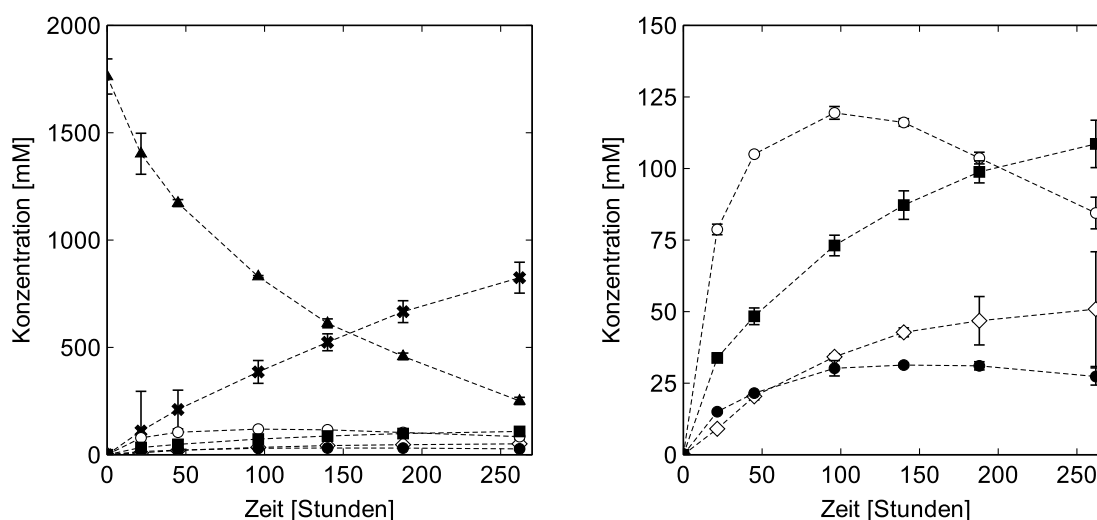


Abbildung 25: Reaktionskinetik der zellfreien Levan-Produktion basierend auf dem Kulturüberstand von *G. japonicus* pBBR1\_p264\_levS1417. Zusätzlich zur Gesamtkinetik (A) wird eine vereinfachte Darstellung der niedrig konzentrierten Fruktooligosaccharide mit angepasster Y-Achse gezeigt (B). Die Fruktose-assoziierten Zucker Saccharose (▲), Fruktose (■), Levan (x), 6-Kestose (○), 1-Kestose (○) und 6-Nystose (◇) wurden in einer Konzentration von mindestens 10 mM mittels HPLC nachgewiesen. Die Levan-Konzentration wird in Fruktose-Äquivalenten ausgedrückt. Das Experiment wurde als Triplikat durchgeführt.

Der Levan-Ertrag der durchgeführten Zell-freien Produktionen war somit unabhängig vom verwendeten Stamm vergleichbar. Durch Halbierung der für die Reaktion erforderlichen Inkubationszeit wurde die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses durch die Plasmid-vermittelte LevS1417-Produktion verdoppelt. Die aus dem Substrat Saccharose freigesetzten Fruktose-Einheiten wurden mit einer Effizienz von  $92,8 \pm 0,5 \%$  in Levan oder FOS mit einem Polymerisierungsgrad (DP)  $\geq 3$  eingebaut. Der Verlust an Fruktose-Einheiten in Form von freier Fruktose entsprach nach 260 Stunden Inkubation  $19,5 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1}$  (7,2 %).



### 3.3.5.3 Molekulargewichtsbestimmung des Zell-frei produzierten Levans

Um das Molekulargewicht des Levans zu bestimmen, das durch das Zell-freie Verfahren produziert wurde, erfolgte eine Analyse des aus der Prozesslösung gewonnenen Präzipitats nach entsprechender Aufbereitung mittels Asymmetrischer Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (Abbildung 26).

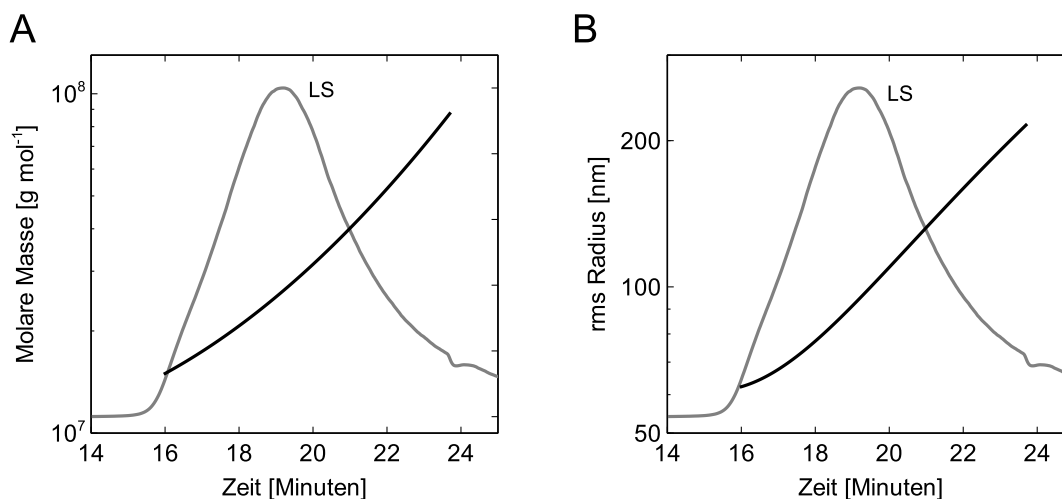


Abbildung 26: Elugramm (Lichtstredetektor) des Zell-frei produzierten Levans aus der AF4-MALLS-UV-Analyse mit Darstellung der ermittelten Molmassen (A) und rms-Radien (B). Das Präzipitat wurde vor der Analyse gegen ein Cutoff von 10.000 – 20.000 Dalton dialysiert. Der Light-Scattering-Wert (LS) ist ein relatives Maß für die Elution des analysierten Fruktan-Gemischs. Die diagonal verlaufende Kalibriergerade spiegelt dabei die molare Masse des zum Zeitpunkt X eluierten Fruktans wieder.

Das polydisperse Levan (Polydispersitätsindex: 1,177) hatte ein durchschnittliches Molekulargewicht  $M_w$  von  $3,22 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ , einen gemittelten rms-Radius  $R_w$  von 113,8 nm und wies in wässriger Lösung eine zufällige, spulartige Sekundärstruktur auf.

## 3.4 Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahrens zur Analyse von Fruktooligosacchariden

Im Zuge der Zell-freien Levan-Produktion und auch während der *in-vitro*-Produktion von Levan durch die rekombinante Levansucrase LevS1417 wurden verschiedene FOS durch die chromatographischen Nachweisverfahren detektiert. Für die beabsichtigte Produktion Levan-basierte FOS und eine valide Identifizierung der FOS, die durch LevS1417 produziert wurden, war die Etablierung eines geeigneten chromatographischen Nachweisverfahrens erforderlich. In den letzten Jahrzehnten konnten sich die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulstem amperometrischem Detektor (HPAEC-PAD) als gängige chromatographische Methoden für die qualitative und quantitative Analyse von Kohlenhydraten etablieren (Sangeetha et al. 2005). Für die chromatographische Analyse von FOS wurden in dieser Arbeit verschiedene Säulenkonfigurationen in Kombination mit einem SpectraSystems (Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland) HPLC-System getestet.

### 3.4.1 Chromatographische FOS-Analytik durch Polymer-basierte Aminex-Trennsäulen

Für erste Analysen wurde eine Aminex HPX-42A der Firma Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland) eingesetzt. Aminex-HPLC-Säulen sind gepackt mit einer Polymer-Matrix (Polystyrol-Divinylbenzol), und trennen Verbindungen nach dem Prinzip der ionenmoderierten Verteilungschromatographie. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Größenausschluss- und Ligandenaustauschchromatographie. Bei der Trennung von Oligosacchariden ist die Größenausschluss-Chromatographie der primäre Trennmechanismus, während bei der Auftrennung von Monosacchariden der Ligandenaustauschmodus überwiegt. Dieser beinhaltet die Bindung der Hydroxylgruppen der Zucker an das fixierte Gegenion des Säulen-Harzes. Der Ligandenaustausch wird durch die Art des Gegenions und durch die räumliche Orientierung der Hydroxylgruppen des Analyten beeinflusst. In verschiedenen Publikationen konnte die beschriebene Aminex HPX-42A Trennsäule für die Analytik von Oligosacchariden eingesetzt werden (Schmidt et al. 1981; Scobell & Brobst 1981; Moura et al. 2007) und wurde daher in dieser Arbeit für die initiale Analyse Levan-basierter FOS genutzt.

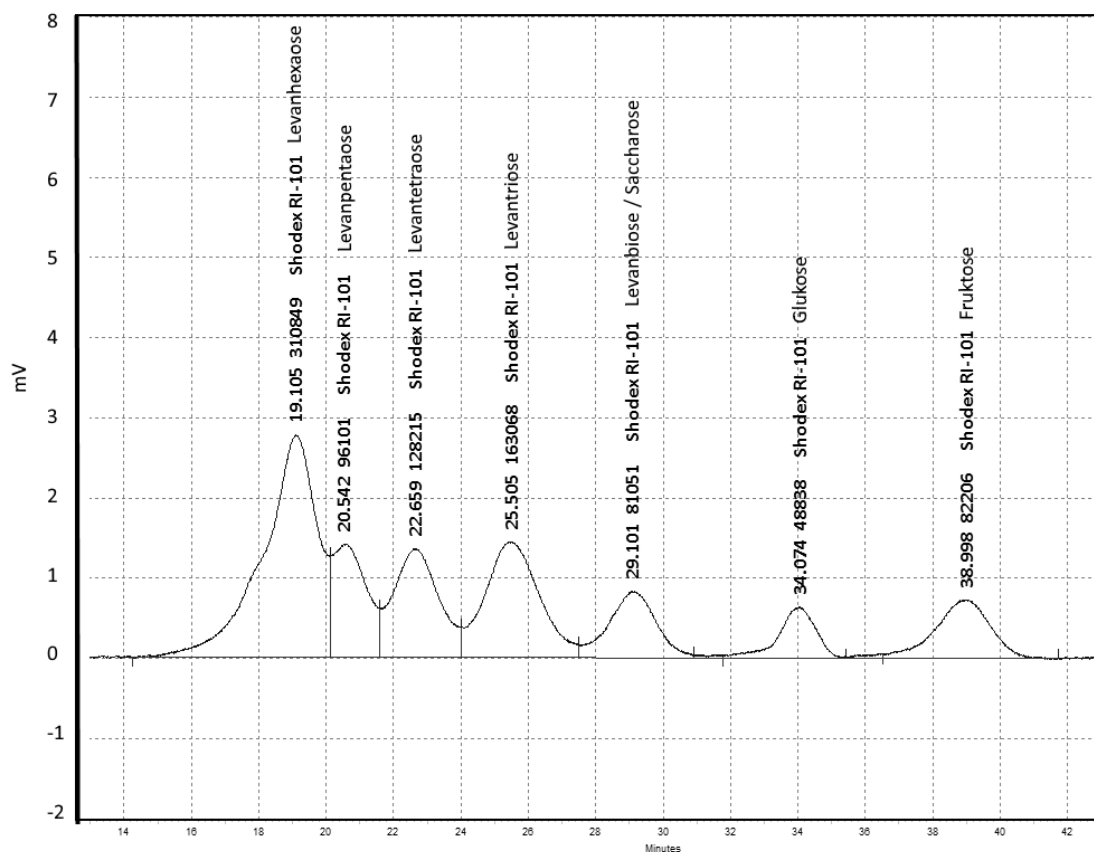


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramm der Reaktionsprodukte der rekombinanten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Trennsäule Aminex HPX-42A von Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland) bei einer Flussrate von 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 65 °C. Die Detektion der Analyten erfolgte über einen Shodex RI-101 Brechungsindexdetektor (Showa Denko K.K.; Tokio, Japan).

Beispielhaft dargestellt ist die Auftrennung der Reaktionsprodukte der rekombinanten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 durch die Aminex HPX-42A in Kombination mit dem „In-Line Carbohydrate Deashing System“ (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland). Die erwähnte Endolevanase katalysiert die Hydrolyse von polymerem Levan in kurzkettige FOS und wird in späteren Kapiteln dieser Arbeit behandelt (Kapitel 3.5). Die enzymatisch hergestellten Oligosaccharide wurden durch die Säule chromatographisch voneinander getrennt (Abbildung 27). Vor allem im Bereich der Monosaccharide lieferte der Ligandenaustausch-Modus eine hochauflösende, Basislinien-getrennte Separation. Für Di- und Oligosaccharide gewährleistete der Größenausschluss-Mechanismus keine ausreichende Trennleistung, da bereits im Bereich von Analyten mit einem Molekulargewicht von  $342 \text{ g mol}^{-1}$  der Größenausschluss-Mechanismus überwog. Dies führte dazu, dass die Verbindungen Saccharose und Levanbiose nicht voneinander separiert wurden und co-eluierten. Für alle Analyten mit einem Molekulargewicht  $\geq 342 \text{ g mol}^{-1}$  konnte keine Basislinien-getrennte Auftrennung erzielt werden, wodurch die Validität der Quantifizierung sank. Des Weiteren konnten so FOS mit gleichem Polymerisierungsgrad aber variierenden Verknüpfungstypen nicht voneinander unterschieden werden. Wie in der Literatur beschrieben ist, können solche heterogenen FOS durch Levansucrasen produziert werden (Raga-Carbajal et al. 2018).

Die beschriebene Säule Aminex HPX-42A wurde, wenn nicht anders erwähnt, für die initialen Analysen der rekombinanten Endolevanasen und für die Extrakt-basierten FOS-Produktion eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente waren die nachfolgend beschriebenen Aminophasen-Trennsäulen noch nicht verfügbar.

### 3.4.2 Chromatographische FOS-Analytik durch Aminophasen-Trennsäulen

Neben Polymer-basierten Säulen mit vorrangigem Größenausschluss-Charakter können auch Silica-basierte Aminophasen für die chromatographische Separierung von Oligosacchariden eingesetzt werden (Herbretau et al. 1995; Zambelli et al. 2014). Aminophasen können grundsätzlich im HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) Modus oder im Anionenaustauschmodus betrieben werden. Der HILIC Modus verbindet dabei die drei gängigsten Methoden der Flüssigkeits-Chromatographie:

1. Normal-Phasen-Chromatographie (NPC), bei der die stationäre Phase meist aus einem polar-modifizierten Kieselgel besteht (SiOH, NH<sub>2</sub>, Diol, etc.).
2. Reverse-Phasen-Chromatographie (RPC), bei der sich die mobile Phase aus einem wässrigen Puffersystem oder Wasser und einem organischen Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Acetonitril, etc.) zusammensetzt.
3. Ionenchromatographie (IC), bei der sich das Anwendungsgebiet über polare Verbindungen sowie organische und anorganische Ionen erstreckt.

Da die Polymer-basierte Aminex HPX-42A keine ausreichende Trennung von langkettigen FOS ermöglichte, wurde das Trennverhalten verschiedener Aminophasen-Säulen der Firma Knauer GmbH (Berlin, Deutschland) untersucht. Zunächst wurde ein Gemisch aus kommerziell erhältlichen

Oligosacchariden des Inulin-Typs zusammen mit Glukose und Saccharose auf einer Eurospher II 100-3 NH<sub>2</sub>, 250 x 3 analysiert. Unter Verwendung der Aminophase wurde eine Basislinien-getrennte Separierung der untersuchten Zucker ermöglicht (Abbildung 28).

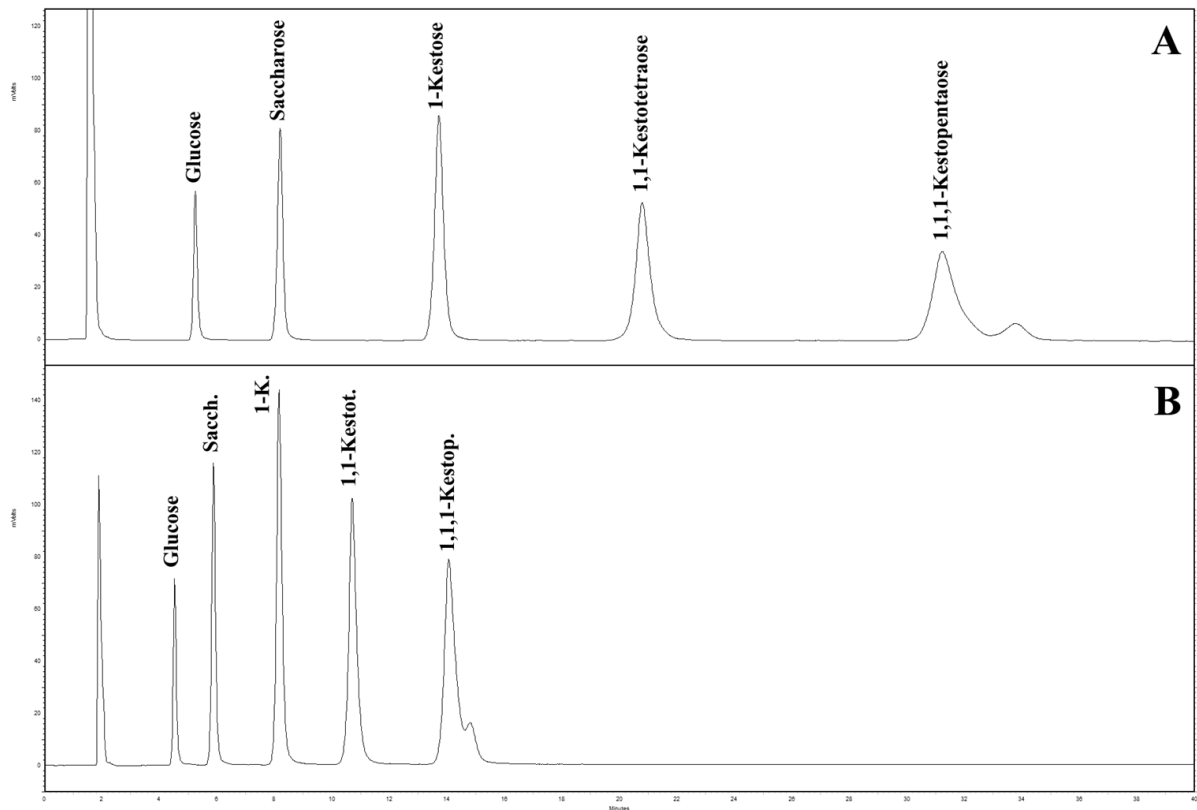


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm eines Zuckergemisch unter Verwendung der Eurospher II 100-3 NH<sub>2</sub>, 250 x 3 Trennsäule der Firma Knauer GmbH (Berlin, Deutschland). Analysiert wurden die Verbindungen Glukose, Saccharose, 1-Kestose, 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose in Konzentrationen von jeweils 5 mM. Als mobile Phase diente 70 % (A) und 65 %-iges Acetonitril (B) bei einer Flussrate von 0,6 ml min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 40 °C. Die Detektion der Analyten erfolgte über einen Shodex RI-101 Brechungsindexdetektor (Showa Denko K.K.; Tokio, Japan).

Die geringe Partikelgröße von 3 µm und die damit verbundene hohe Anzahl theoretischer Trennböden führte zu sehr hohen Auflösungen, jedoch auch zu einer langen Laufzeit (Abbildung 28A). Um die Laufzeit der Messung zu verringern und den Probendurchsatz somit zu erhöhen, wurde die Acetonitril-Konzentration der mobilen Phase von 70 % auf 65 % reduziert. Der erhöhte Wasser-Anteil führte dazu, dass alle fünf Analyten in unter 15 Minuten von der Säule eluierten (Abbildung 28B). Dabei ermöglichte der HILIC-Modus der verwendeten Aminophase trotz der schnellen Analyse-Zeit eine Basislinien-Trennung der analysierten Verbindungen. Um die Analyse-Zeit weiter zu verringern und die Auftrennung langkettiger FOS zu ermöglichen, die im Zuge der Endolevanase-vermittelten Levan-Hydrolyse akkumulieren könnten, wurde eine Eurospher Aminophase mit erhöhtem Partikeldurchmesser getestet. Die Eurospher II 100-5 NH<sub>2</sub>, 250 x 3 weist eine Partikelgröße von 5 µm auf, wodurch die Trennbödenzahl im Vergleich zur 3 µm-Säulenvariante verringert und somit die Retention der Analyten verkürzt wird. Wie erwartet, eluierten die fünf Zucker des aufgetrennten

Kohlenhydrat-Gemischs schneller von der Trennsäule als unter Verwendung der Eurospher Säule mit 3  $\mu\text{m}$  Partikeldurchmesser (Abbildung 29).

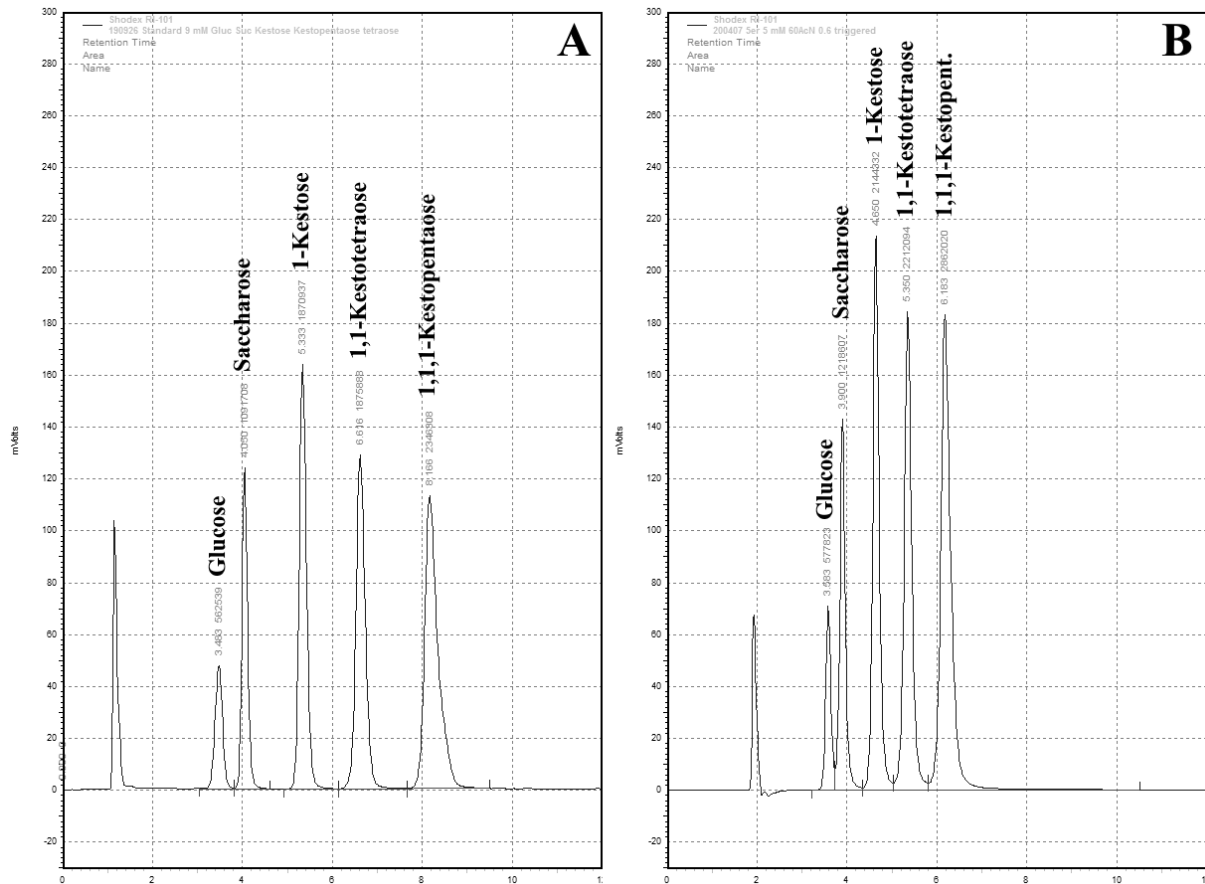


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm eines Zuckergemisch unter Verwendung der Eurospher II 100-5  $\text{NH}_2$ , 250 x 3 Trennsäule der Firma Knauer GmbH (Berlin, Deutschland). Analysiert wurden die Verbindungen Glukose, Saccharose, 1-Kestose, 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose in Konzentrationen von jeweils 5 mM. Als mobile Phase diente 65 % (A) und 60 %-iges Acetonitril (B) bei einer Flussrate von  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  und einer Säulentemperatur von  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Detektion der Analyten erfolgte über einen Shodex RI-101 Brechungsindexdetektor (Showa Denko K.K.; Tokio, Japan).

Durch den Einsatz von 65 %-igem Acetonitril eluierten alle Komponenten des Zucker-Gemischs Basislinien-getrennt in unter neun Minuten (Abbildung 29A). Durch Erhöhung des Wasser-Anteils auf 40 % konnten die Zucker in unter sieben Minuten vom RI-Detektor nachgewiesen werden (Abbildung 29B). Einzig Glukose und Saccharose wiesen unter diesen Messbedingungen keinen vollständige Basislinien-Trennung auf. Für nachfolgende Messungen wurden daher geringere Proben-Konzentrationen und höhere Acetonitril-Konzentrationen verwendet, um eine vollständige Trennung der Analyten und zugleich die Auftrennung von FOS mit gleichem DP aber variierendem Verknüpfungstypen zu gewährleisten. Ein Nachteil von Silica-basierten Trennsäulen, der in der Literatur beschrieben und auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist die hohe Anfälligkeit der Säulenmatrix gegenüber sauren pH-Werten oder reaktiven Analyten (Tanaka et al. 2003). Dieser Effekt wurde auch in dieser Arbeit beobachtet und führte dazu, dass die Analyten mit zunehmender Lebensdauer der Säule verkürzte Retentionszeiten zeigten, was eine kontinuierliche Anpassung der

Laufmittelzusammensetzung erforderlich machte. Um gleichbleibende Messbedingungen mit erhöhter Reproduzierbarkeit zu ermöglichen, wurde neben den Silica-basierten Aminophasen auch eine Polymer-basierte Aminophase der Firma ShowaDenko K.K. (Tokio, Japan) getestet. Diese Säulenkonfiguration setzte sich aus der Asahipak NH2P-40 3E (250 x 3.0 mm) Trennsäule in Kombination mit der Vorsäule Asahipak NH2P-50G 3A (10 x 3.0 mm) und dem Line-Filter Asahipak NH2P-LF (75 x 8.0 mm) zusammen. Die Polymer-basierte Aminophase ermöglichte eine Basislinien-Trennung für zahlreiche FOS mit unterschiedlichen Monomer-Zusammensetzungen (Abbildung 30).

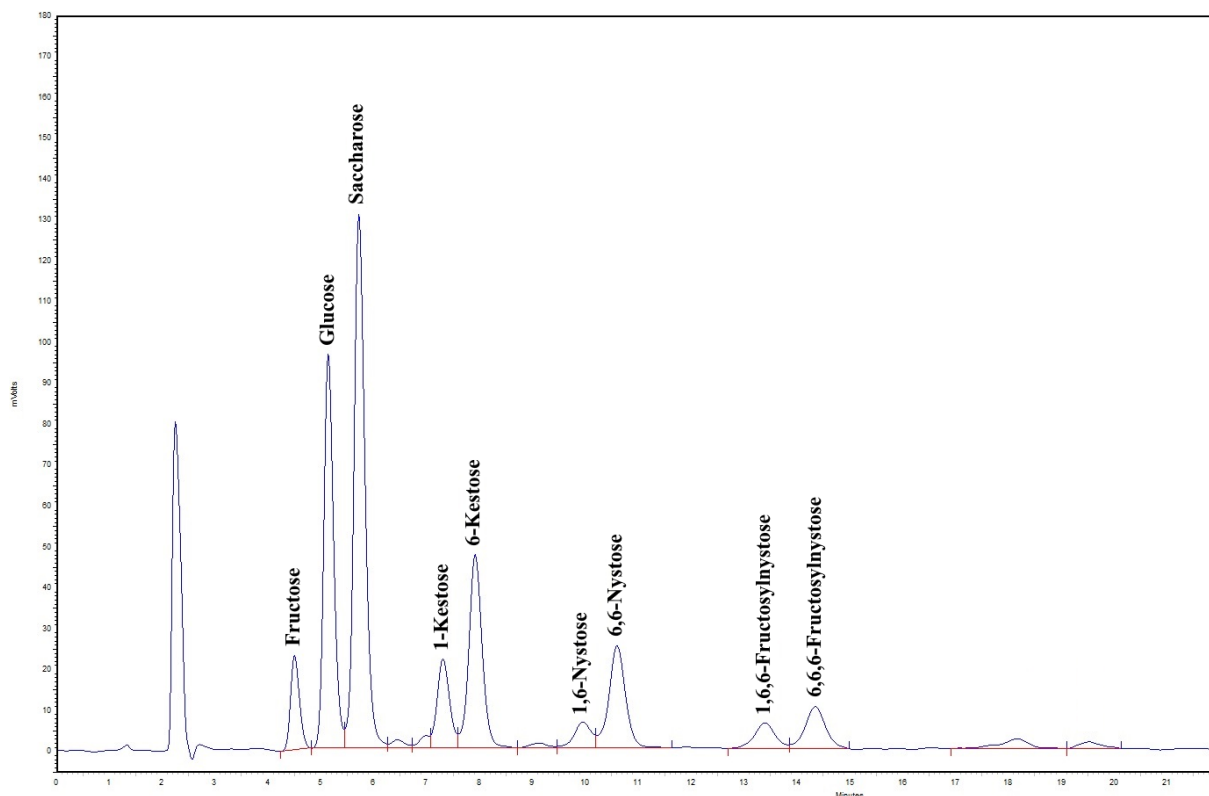


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm eines Zuckergemisch unter Verwendung einer Asahipak NH2P-40 3E (250 x 3.0 mm) Trennsäule in Kombination mit der Vorsäule Asahipak NH2P-50G 3A (10 x 3.0 mm) und dem Line-Filter Asahipak NH2P-LF (75 x 8.0 mm) der Firma ShowaDenko K.K. (Tokio, Japan). Analysiert wurden die Reaktionsprodukte des bi-enzymatischen Systems zur Produktion Levan-basierter FOS. Als mobile Phase diente 65 %-iges Acetonitril bei einer Flussrate von  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  und einer Säulentemperatur von  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Detektion der Analyten erfolgte über einen Shodex RI-101 Brechungsindexdetektor (Showa Denko K.K.; Tokio, Japan).

Auch Zucker mit gleichem Polymerisierungsgrad aber variierendem Verknüpfungstypen, wie beispielsweise die Trisaccharide 1-Kestose und 6-Kestose, wurden voneinander separiert. Die Asahipak-Säulenkombination zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität, sodass sich die Retentionszeiten mit zunehmender Nutzung nur geringfügig änderten.

### 3.5 Charakterisierung von Endolevanasen für die Produktion von Fruktooligosacchariden

Bei ersten Untersuchungen mit der rekombinanten Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 zeigte sich eine enorme Viskositätserhöhung der entsprechenden Reaktionslösung. Dies erschwerte eine Probenaufbereitung und führte zu Fehlern in der quantitativen Bestimmung der Reaktionsprodukte und -produkte. Um diese Problematik zu umgehen und für die beabsichtigte Produktion Levan-basierter Fruktooligosaccharide, wurde ein Screening nach geeigneten Endolevanasen durchgeführt. Diese Hydrolasen der Enzymklasse 3.2.1.65 sind in der Lage  $\beta$ -2,6-glykosidische Bindungen spezifisch zu hydrolysieren. Die Hydrolyse erfolgt dabei, anders als bei den Exolevanasen, die terminale Fruktose-Einheiten vom Levan-Polymer abspalten, endo-hydrolytisch, was zur Freisetzung von FOS mit variierendem Polymerisierungsgrad führt. Der enzymatische Abbau des polymeren Levans und die damit verbundene Verringerung der Viskosität sollte eine valide Probenaufbereitung und zeitgleich die Produktion präbiotischer FOS gewährleisten.

#### 3.5.1 Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Endolevanasen

Zwecks heterologer Protein-Produktion wurden die kodierenden Sequenzen dreier Endolevanasen in separate pASK-IBA5 Überexpressionsvektoren eingebracht. Ausgewählt wurden die Endolevanase LevB<sub>1</sub> aus *Bacillus licheniformis* DSM 13, die Endolevanase BT1760 aus *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079 und die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *Azotobacter chroococcum* DSM 2286. Die beiden erstgenannten Enzyme wurden bereits hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Hydrolyse von polymerem Levan untersucht (Porrás-Domínguez et al. 2014; Mardo et al. 2017; Porrás-Domínguez et al. 2017). Bei der Endolevanase aus *A. chroococcum* DSM 2286 handelte es sich um ein uncharakterisiertes Enzym. Durch die Auswahl der für die Amplifikation genutzten Oligonukleotid-Primer (Kapitel 2.2.2) wurden die in Abbildung 31 schwarz dargestellten, N-terminalen Signal-Sequenzen und Transmembrandomänen deletiert.

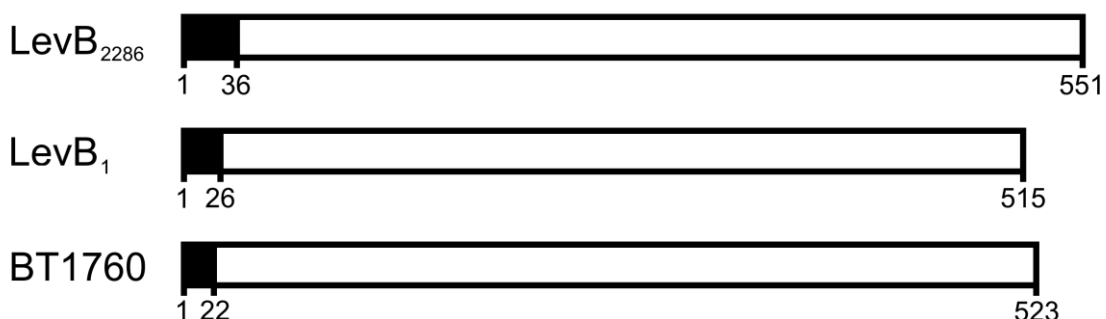


Abbildung 31: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Endolevanasen. Aminosäuren, die für die Klonierung relevant waren, sind nummerisch gekennzeichnet. N-terminale Bereiche, die im Zuge der Klonierung deletiert wurden, sind in schwarz dargestellt. Bei den Endolevanasen LevB<sub>2286</sub> und BT1760 konnte bioinformatisch ein N-terminales Signalpeptid identifiziert werden. Die Endolevanase LevB<sub>1</sub> verfügte N-terminal über eine Transmembrandomäne.

Des Weiteren wurden über die Primer *BsaI*-Schnittstellen stromaufwärts und stromabwärts der codierenden Nukleotid-Sequenz eingebracht. Durch einen Verdau der aufgereinigten Amplifikate sowie des pASK-IBA5 Vektors durch die Restriktionsendonuklease *BsaI* wurden durch eine anschließende Ligation die finalen Konstrukte pASK5\_levB2286\_oSP, pASK5\_levB1\_oTMD und pASK5\_bt1760\_oSP generiert (Abbildung 32A).

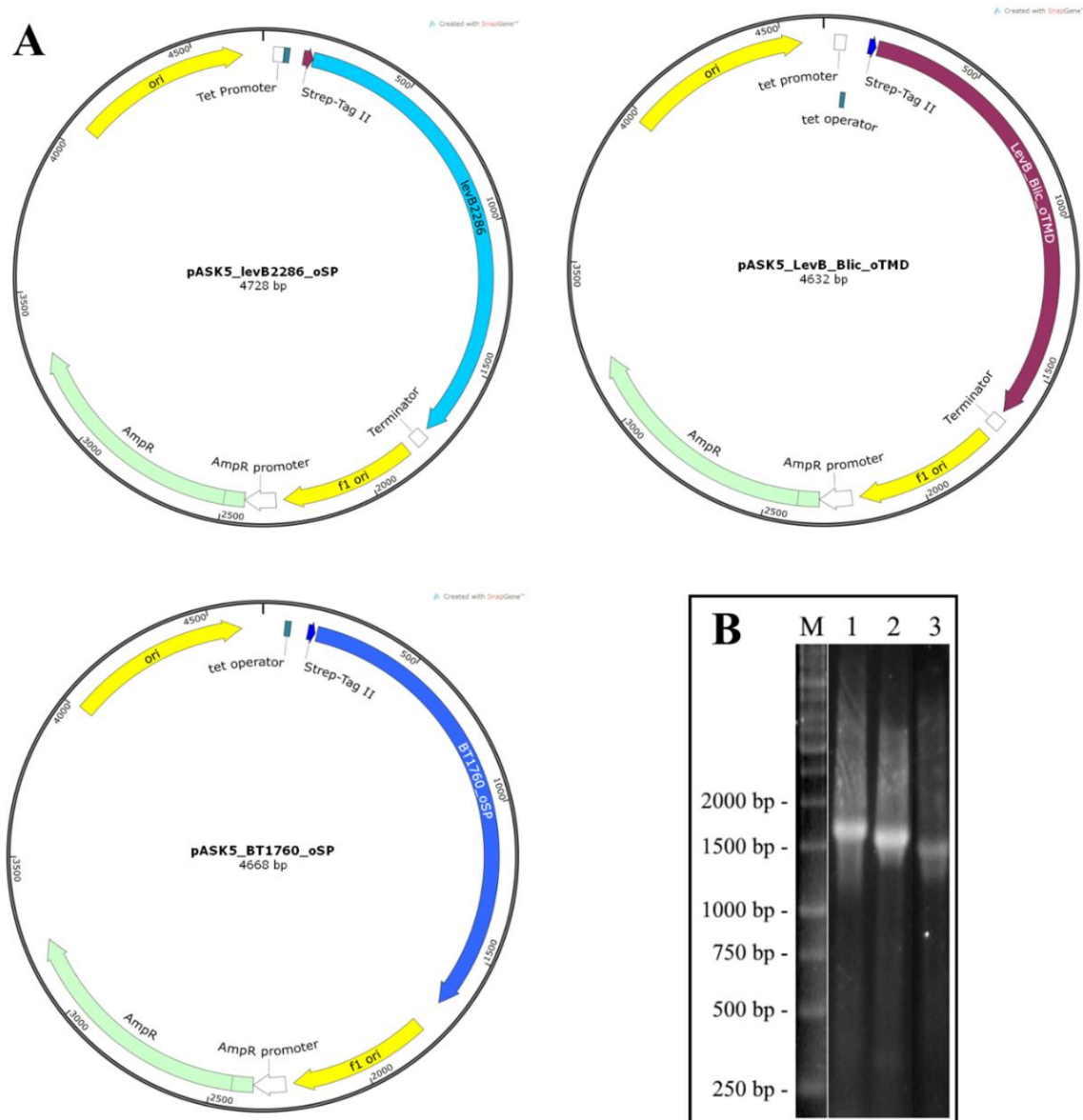


Abbildung 32: Plasmidkarten der Überexpressionsplasmide zur heterologen Produktion der Endolevanasen aus *A. chroococcum* DSM 2286, *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 und *B. licheniformis* DSM 13 in *E. coli* NEB5-alpha (A) und UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR (B) zur Verifizierung der Stämme *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levB2286\_oSP (1), *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_bt1760\_oSP (2) und *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levB1\_oTMD (3). Als Referenzmarker (M) wurde die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) eingesetzt.

Im Anschluss an die Transformation der Plasmide in kompetente *E. coli* NEB5-alpha Zellen erfolgte eine Kolonie-PCR, die eine korrekte Klonierung und Aufnahme der Plasmide zeigen konnte (Abbildung



32B). Die generierten Amplifikate entsprachen den prognostizierten Fragmentgrößen von 1601 bp (LevB<sub>2286</sub>), 1540 bp (BT1760) und 1504 bp (LevB<sub>1</sub>). Das für die Klonierung genutzte Expressionsplasmid pASK-IBA5 ermöglichte die präzise Fusion zwischen der Endolevanasen und dem Vektor-kodierten Strep-Tag II. Dies erlaubte eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie, wodurch die Ausbeute der Enzyme bestimmt und diese für enzymatische Assays eingesetzt werden konnten. Relevante Proteinmengen wurden in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen, was auf die Produktion rekombinanter, Strep-Tag gekoppelter Proteine hinwies (Abbildung 33). Die Ausbeuten der gereinigten Enzyme variierten, wobei die Endolevanase aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 offenbar am effizientesten rekombinant in *E. coli* produziert werden konnte ( $20 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Die Ausbeute der Endolevanasen aus *B. licheniformis* DSM 13 und *A. chroococcum* DSM 2286 betrug  $8,3 \pm 1,4$  bzw.  $13,9 \pm 0,6 \text{ mg Protein L}^{-1}$  Kultur.

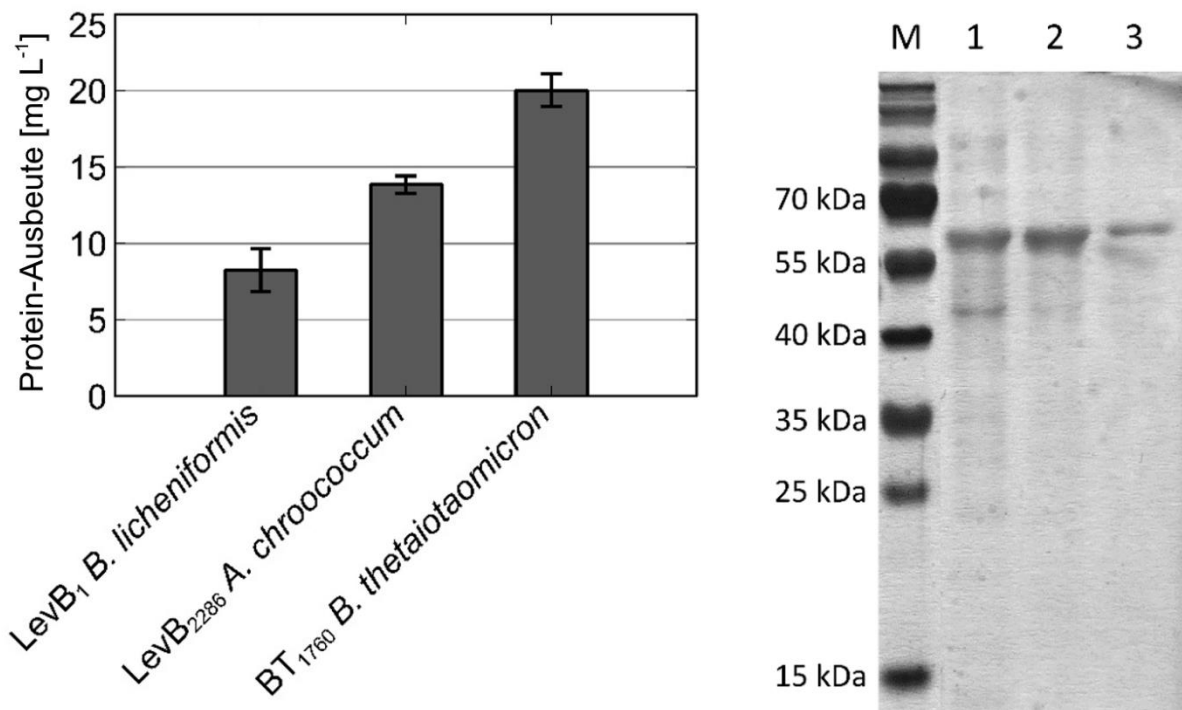


Abbildung 33: Proteinausbeuten verschiedener Endolevanasen nach heterologer Produktion in *E. coli* NEB5a und anschließender Aufreinigung durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (A). Silbergefärbtes SDS-Gel der generierten Elutionsfraktionen (B). Die PageRuler™ Prestained Proteinladder (M) wurde als Referenz für die SDS-PAGE der Endolevanasen aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 (Lane 1), *B. licheniformis* DSM 13 (Lane 2) und *A. chroococcum* DSM 2286 (Lane 3) verwendet.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung konnte die Abwesenheit größerer Verunreinigungen bestätigt werden. Für alle Endolevanasen wurden deutliche Proteinbanden generiert, die den vorhergesagten Molekularmassen von 58,4 (*B. thetaiotaomicron*), 57,2 (*B. licheniformis*) & 58,7 (*A. chroococcum*) kDa entsprachen.

### 3.5.2 Produktspektren der rekombinanten Endolevanasen

Der Begriff „Ballaststoffe“ umfasst eine Vielzahl von Kohlenhydraten, die gegen menschliche Verdauungsenzyme resistent sind und durch die Darm-Mikrobiota fermentiert werden, was positive

physiologische Wirkungen vermittelt. Die Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates legt fest, dass nur Kohlenhydratpolymere, die aus drei oder mehr Monomer-Einheiten bestehen, als Ballaststoffe deklariert werden können. Daher sollte durch eine detaillierte Analyse der Produktspektren der rekombinanten Endolevanasen überprüft werden, ob eines der Enzyme vorteilhafte Eigenschaften für die Produktion von kurzkettigen Ballaststoffen aufwies.

### 3.5.2.1 Aktivitätsbestimmung von Endolevanasen durch RBB-Levan

Die Aktivitätsbestimmung von Endolevanasen durch eine chromatographische Quantifizierung der Reaktionsprodukte ist zwar eine sehr exakte aber auch eine enorm Zeit- und Ressourcenintensive Methode. Vor allem für routinemäßige Aktivitätsmessungen im Zuge von Enzymcharakterisierungen ist die HPLC-Methodik suboptimal. Eine schnelle und valide Alternative ist eine photometrische Bestimmung der freigesetzten Hydrolyse-Produkte. Voraussetzung für einen solchen Ansatz ist die spezifische Lichtabsorption der gelösten Substanzen bei definierter Wellenlänge. Im Bereich der Glykochemie und -biologie konnten sich colorimetrische Substrate etablieren, bei denen ein zu untersuchendes Substrat mit stark absorbierenden Farbstoffen gekoppelt wurde, um eine vereinfachte Charakterisierung von Glykosidasen zu ermöglichen (Biely et al. 1985; Basran et al. 2010; Tiboni et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde Levan, welches mit Hilfe der rekombinanten Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 produziert wurde, mit dem in Abbildung 34 abgebildeten Anthrachinonfarbstoff Remazol Brilliant Blau R gekoppelt. Nach Durchführung des Synthese-Protokolls konnte ein tiefblaues, wasserlösliches Präzipitat gewonnen werden. Durch saure Hydrolyse einer definierte RBB-Levan-Lösung und anschließender HPLC-Analyse wurde der Fruktose-Gehalt des RBB-Levans bestimmt. Simultan wurde die für die Hydrolyse eingesetzte Lösung einer Absorptionsbestimmung unterzogen, wodurch eine Kopplungseffizienz von 0,145 % ermittelt wurde. Demnach wies etwa jedes 700. Fruktose-Molekül des Levan-Polymers eine Bindung zum Farbstoff RBB auf.

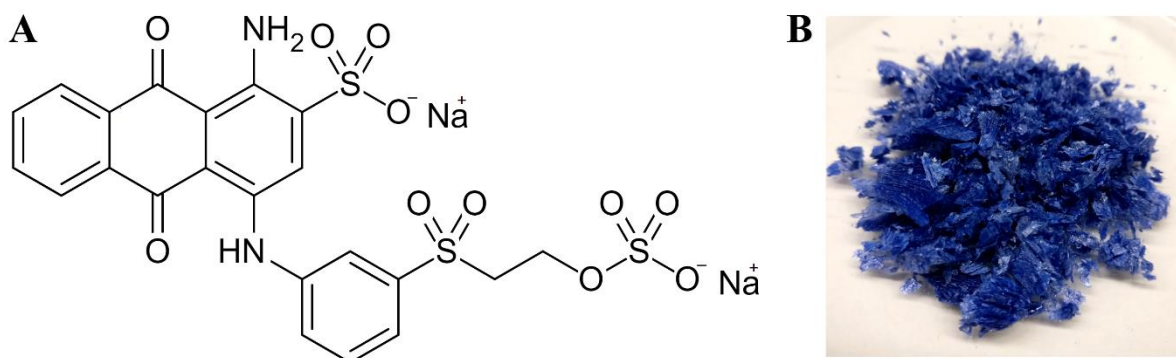


Abbildung 34: Strukturformel von Remazol Brilliant Blau R (A) und blaues Lyophilisat im Anschluss an die Synthese von RBB-Levan (B).

Für eine erste Evaluierung der produzierten, gefärbten Substanz wurde diese in separaten Ansätzen für eine Aktivitätsbestimmung mit den rekombinanten Endolevanasen aus Kapitel 3.5.1 Produktion und Aufreinigung der rekombinanten Endolevanasen dieser Arbeit inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 30 °C wurden die Ansätze durch Zugabe von vier Teilen 96 %-igem [v/v] Ethanol vollständig gefällt, durch Vortexen stark durchmischt und für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Bei erfolgreicher Hydrolyse von RBB-Levan durch die zugefügten Endolevanasen sollten nicht-präzipitierbare FOS dem Überstand eine bläuliche Färbung verleihen. Eine solche Blaufärbung konnte unter Verwendung der Endolevanasen LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* DSM 13 und BT1760 aus *B. thtaiotaomicron* BT1760 beobachtet werden (nicht dargestellt). Die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 schien das modifizierte Levan nicht zu hydrolysieren. Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität wurde für nachfolgende Assays die Endolevanase BT1760 eingesetzt (Mardo et al. 2017; Porrás-Domínguez et al. 2014). Um die makroskopisch nachgewiesene Blaufärbung des Fällungsüberstandes zu verifizieren, wurde ein Reaktionsansatz erstellt, dem regelmäßig Proben für einen photometrischen Nachweis der RBB-Levan-Hydrolyse entnommen wurden. Wie Abbildung 35A zeigt, konnte die photometrische Analyse eine Zunahme der Absorption über die Zeit bestätigen. Im Gegensatz zur Wasserkontrolle, bei der keine Änderung der Absorption detektiert wurde, führte die hydrolytische Aktivität von BT1760 im Fällungsüberstand zu einem linearen Absorptionsanstieg über die Zeit ( $R^2 = 0,9703$ ;  $\Delta\text{Absorption}_{595\text{nm}} \text{ min}^{-1} = 0,003506$ ). Die Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge sollte anschließend eine Korrelation zwischen Enzym-Konzentration und Absorptionsänderung zeigen (Abbildung 35B+C).

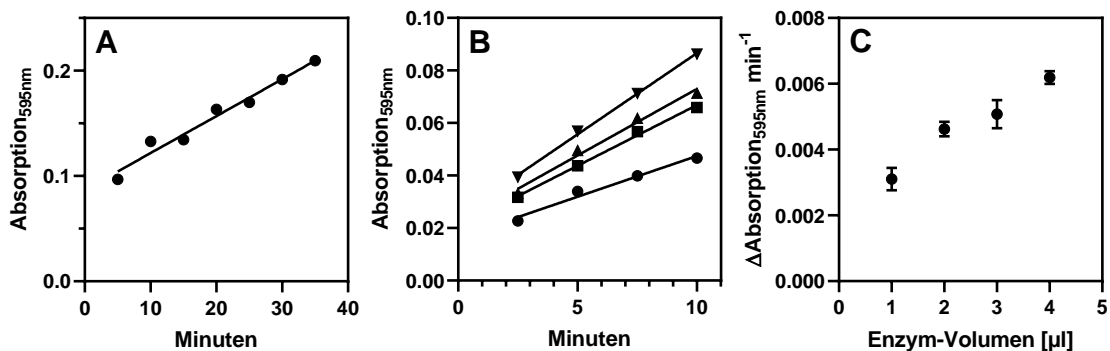


Abbildung 35: Photometrischer Nachweis der RBB-Levan-Hydrolyse unter Verwendung der rekombinanten Endolevanase BT1760 aus *B. thtaiotaomicron* DSM 2079. Dargestellt sind die lineare Zunahme der Absorption bei einer definierten (A) und variierenden Enzym-Konzentrationen (B), sowie die aus Abbildung B generierten Steigungen, die die Zunahme der Absorption  $\text{min}^{-1} \mu\text{l}^{-1}$  Enzym-Fraktion widerspiegeln (C). Für Abbildung A wurden 25  $\mu\text{l}$  und für Abbildung B 1, 2, 3 und 4  $\mu\text{l}$  der gereinigten Endolevanase BT1760 zugefügt. Die Proteinkonzentration der verwendeten Elutionsfraktion lag bei 0,8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Die Erhöhung des zugesetzten Eluat-Volumens auf 2, 3 und 4  $\mu\text{l}$  resultierte zwar in einer stärkeren Zunahme der Absorption über die Zeit, jedoch korrelierte die Intensivierung der Blaufärbung ( $\Delta\text{Absorption}_{595\text{nm}} \text{ min}^{-1}$ ) nicht quantitativ mit der Erhöhung der Enzym-Menge. Aufgrund der nicht nachweisbaren Aktivität unter Verwendung der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> und der ausbleibenden

Korrelation zwischen eingesetzter Enzym-Menge und Absorptionszunahme über die Zeit wurde das synthetisierte RBB-Levan nicht für die Charakterisierung der rekombinanten Endolevanasen eingesetzt. Nichtsdestotrotz könnte es sich bei dem gefärbten Fruktan um ein geeignetes Substrat für die Charakterisierung von Endo- und Exolevanasen handeln. Wie beschrieben, zeigten die Endolevanasen aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 und *B. licheniformis* DSM 13 Aktivität mit dem modifizierten Levan, sodass ein RBB-basierter Assay Zeit- und Kostenaufwändige Methoden wie die DNS-Quantifizierung oder HPLC-Analysen ersetzen könnte.

### **3.5.2.2 Produktspektren rekombinanter Endolevanasen unter Verwendung von pflanzlichem Levan**

Als alternatives Substrat für die Aufklärung der Produktspektren wurde aus Timothy Gras isoliertes, kommerzielles Levan der Firma Megazyme (Bray, Irland) eingesetzt. Levan aus Timothy Gras wurde bereits für die Charakterisierung von Endolevanasen eingesetzt und erwies sich als in der entsprechenden Studie als geeignetes Substrat (Mardo et al. 2017). Alle drei heterolog produzierten Endolevanasen waren in der Lage, das supplementierte Levan zu hydrolysieren, wobei sich die erzeugten FOS-Spektren stark unterschieden (Abbildung 36A- C). Hinsichtlich der beabsichtigten Herstellung von Levan-FOS mit einem Polymerisierungsgrad von mindestens drei Monomer-Einheiten ( $DP \geq 3$ ) erwies sich die Endolevanase LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* DSM 13 als ungeeignet (Abbildung 36B). Das Enzym setzte signifikante Mengen Fruktose und Levanbiose frei und schien vor allem im späten Verlauf der Reaktion die relevanten langkettigen FOS zu hydrolysieren. Darüber hinaus zeigte das Produktspektrum eine hohe Heterogenität, da das Enzym FOS mit gleichem DP, aber unterschiedlichem Elutionsverhalten produzierte. Dies zeigte sich im Verlauf der chromatographischen Analyse durch das Auftreten von Doppelpeaks oder Peakschultern (Abbildung 36B).

Das Produktspektrum, das mit der Endolevanase aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 generiert werden konnte, entsprach den Ergebnisse von Mardo et al. (2017). Die Wissenschaftler untersuchten ebenfalls das hydrolytische Verhalten der Endolevanase BT1760, obwohl sich ihre Klonierungsstrategie und damit das Proteinkonstrukt von dem hier verwendeten Protein unterschied (Mardo et al. 2017). In dieser Arbeit führte die katalytische Aktivität von BT1760 in der frühen Phase der Reaktion zur Produktion von FOS mit einem DP von 2 bis 8 (Abbildung 36C). Im späten Verlauf der Reaktion wurde eine Akkumulation von Fruktose, Levanbiose und insbesondere Levantriose beobachtet. Mit Levantriose als primärem Reaktionsprodukt ist BT1760 grundsätzlich für die Herstellung von Levan-FOS geeignet, die der Ballaststoff-Deklaration entsprechen. Dennoch verringerte die Zunahme der unerwünschten Produkte Fruktose und Levanbiose im Laufe der Zeit die Effizienz und Ausbeute des Prozesses, der auf die Herstellung hoher Mengen an Ballaststoffen abzielt.

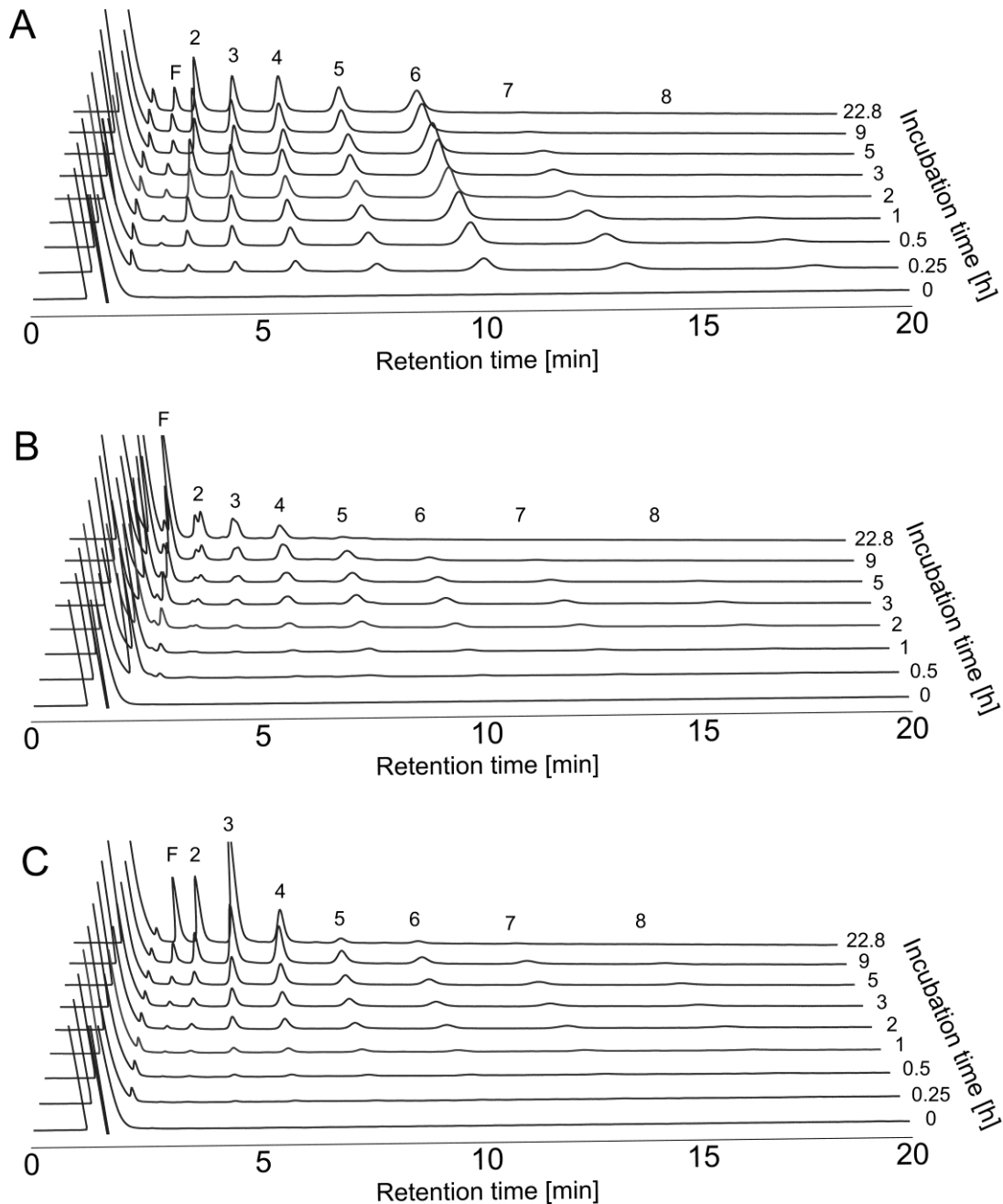


Abbildung 36: Produktspektren rekombinanter Endolevanasen aus *A. chroococcum* DSM 2286 (A), *B. licheniformis* DSM 13 (B) und *B. thaitotaomicron* DSM 2079 (C). Als Substrat diente kommerzielles Levan, das aus Timothy Gras isoliert wurde. Die durch die hydrolytische Aktivität der Enzyme freigesetzten Reaktionsprodukte wurden mittels Aminophase-HPLC detektiert und quantifiziert. Abgebildet ist ein beispielhaftes Replikat des durchgeführten biologischen Duplikats. Die Zahlen am oberen Rand der Abbildungen A-C geben die DP-Werte der generierten FOS an; F, Fruktose.

Die hier erstmals charakterisierte Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 zeigte ein nahezu ideales Produktspektrum. Das Enzym ermöglichte eine schnelle Umsetzung des supplementierten Levans und produzierte vorwiegend FOS mit einem DP zwischen 2 – 7 (Abbildung 36A). Auch bei deutlich verlängerter Inkubationszeit blieb die Menge an freigesetzter Fruktose und Levanbiose auf einem niedrigen Niveau. Wie die quantitative Auswertung der durch LevB<sub>2286</sub>



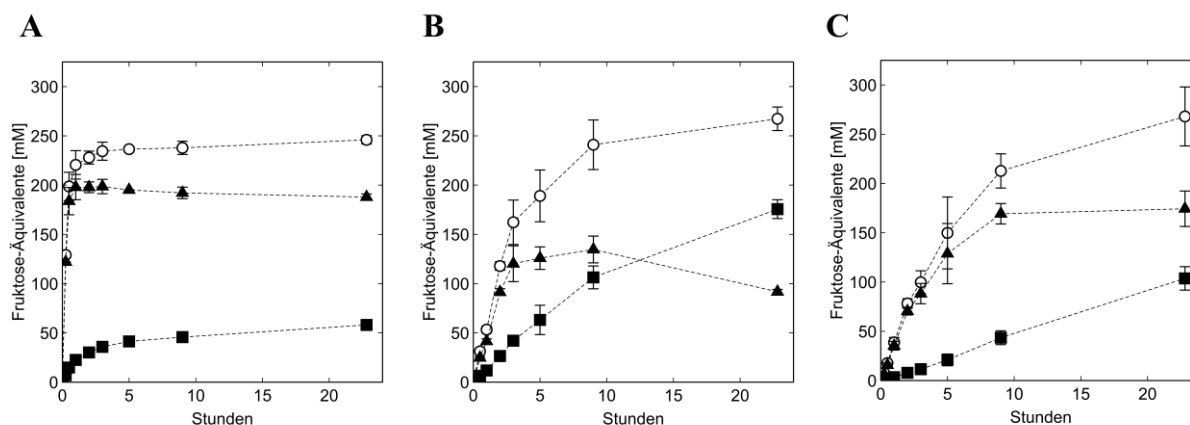


Abbildung 38: Quantitative Darstellung der Reaktionsprodukte, die durch die Endolevanasen LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 (A), LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* DSM 13 (B) und BT1760 aus *B. thtaiotaomicron* DSM 2079 (C) erzeugt wurden. Die gesamten Reaktionsprodukte (○) wurden unterteilt in FOS mit einem DP  $\geq 3$  (▲) und Produkte mit einem DP  $< 3$  (■).

Im Gegensatz dazu brauchten die Endolevanasen aus *B. licheniformis* DSM 13 (Abbildung 38B) und *B. thtaiotaomicron* DSM 2079 (Abbildung 38C) wesentlich länger für die Umsetzung des supplementierten Levans und produzierten größere Mengen an Fruktose und Levanbiose. Der Anteil an Reaktionsprodukten mit einem DP  $< 3$  lag nach Ablauf der Inkubation unter Verwendung von LevB<sub>1</sub> bei 65,7 % und im Fall von BT1760 bei 38,7 %. Nach Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates können diese Produkte nicht als Ballaststoffe deklariert werden.

### 3.5.2.3 Produktspektrum von LevB<sub>2286</sub> unter Verwendung von bakteriellem Levan

Pflanzliches Levan und bakterielles Levan können sich strukturell und vor allem hinsichtlich des Molekulargewichts voneinander unterscheiden (Barone & Medynets 2007). So ist die molare Masse von pflanzlichem Levan häufig deutlich niedriger als die von bakteriellem Levan, welches zusätzlich verzweigte makromolekulare Strukturen aufweisen kann (Ehrlich et al. 1975; Stivala et al. 1975; Kasapis et al. 1994). Um das hydrolytische Verhalten der rekombinanten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> gegenüber bakteriellem Levan zu untersuchen, wurde mit Hilfe der aufgereinigten Levansucrase LevS1417 polymeres Levan synthetisiert und mittels ethanolischer Fällung präzipitiert. Das ausgefällte Polymer wurde dialysiert, lyophilisiert und anschließend für den enzymatischen Assay eingesetzt. Die mittels Aminphasen-HPLC durchgeführte Quantifizierung der Reaktionsprodukte ist in Abbildung 39 abgebildet. Das Produktspektrum zeigte grundsätzlich große Ähnlichkeit zu dem in Abbildung 37 dargestellten Produktspektrum, für welches pflanzliches Levan als Substrat diente. Unter Verwendung von bakteriellem Levan konnte Levanhexaose erneut als primäres Hydrolyse-Produkt von LevB<sub>2286</sub> identifiziert werden. Die Verbindung wies nach 21 Stunden Inkubation eine Konzentration von 147,1 mM auf (ausgedrückt in Fruktose-Äquivalenten), was einem relativen Produkt-Anteil von 32 % entspricht. Anders, als beim pflanzlichen Levan, bei dem die Produkte maximal einen Polymerisationsgrad von 8 zeigten, konnten ausgehend von bakteriellem Levan-FOS bis zu einem DP von 11 gebildet werden.

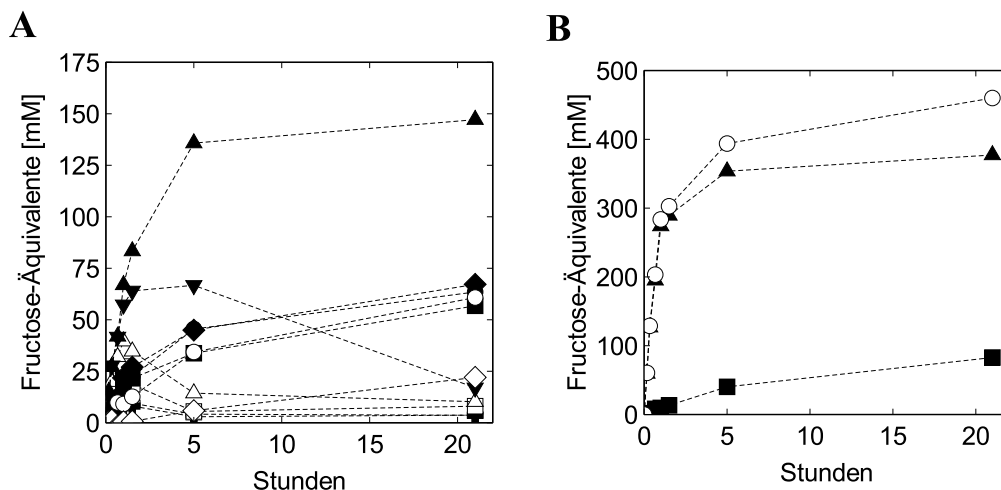


Abbildung 39: Einzel-Darstellung (A) und kombinierte Darstellung (B) der durch LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 erzeugten Reaktionsprodukte. Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* NEB5-alpha hergestellt und durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Levan, welches durch die aufgereinigte Levansucrase LevS1417 synthetisiert wurde, diente als Substrat für die enzymatische Reaktion. Die Produkte Fruktose (◇), Levanbiose (○); Levantriose (●), Levantetraose (◆), Levanpentaose (■), Levanhexaose (▲), Levanheptaose (▼) und Levanoktaose (▽), Levannonaose (□), DP10 (⊕) und DP11 (⊕) wurden mittels Aminophase-HPLC analysiert und quantifiziert und werden in Fructose-Äquivalenten ausgedrückt. Für die kombinierte Darstellung (B) wurden die gesamten Reaktionsprodukte (○) unterteilt in FOS mit einem DP ≥ 3 (▲) und Produkte mit einem DP < 3 (■).

Alle Hydrolyse-Produkte mit einem DP > 6 wurden nach einem anfänglichen Konzentrations-Anstieg kontinuierlich degradiert. Für die relevanten FOS mit einem DP zwischen 3 und 5 konnte keine enzymatische Hydrolyse beobachtet werden. Insgesamt lag der relative Anteil an FOS mit einem DP ≥ 3 nach vollständiger Umsetzung des supplementierten Levans bei 82 %. Ausgehend von pflanzlichem Levan lag dieser Anteil auf einem nahezu identischen Level von 84 %.

### 3.5.3 Enzymatische Charakterisierung der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286

Nachdem die Analyse des Produktspektrums der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> deren vorteilhaften hydrolytischen Eigenschaften aufdeckte, wurde eine detaillierte Charakterisierung des Enzyms durchgeführt. Eine kinetische Studie des Proteins zeigte, dass sich LevB<sub>2286</sub> entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik verhielt. Mittels nicht-linearer Regression wurde ein  $V_{\max}$  von  $6685 \pm 224 \text{ U mg}^{-1}$  und ein  $K_M$ -Wert von  $188 \pm 16 \text{ mM}$  bestimmt, was unter physiologischen Bedingungen einem  $k_{\text{cat}}$  von  $6554 \pm 219 \text{ s}^{-1}$  und einer katalytischen Effizienz von  $29,3 \pm 1,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entsprach (Abbildung 40A). Unter den Levan-abbauenden Enzymen mit endo-hydrolytischem Reaktionsmechanismus zeigte die Endolevanase BT1760 aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 mit  $310 \text{ U mg}^{-1}$  die bisher höchste Aktivität (Mardo et al. 2017). Trotz N-terminaler Modifikation, zeigte die in dieser Studie untersuchte, verkürzte Version von BT1760 nahezu identische Aktivitätswerte ( $333 \text{ U mg}^{-1}$ ; nicht dargestellt). Insgesamt war die spezifische Aktivität der hier untersuchten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> 20-mal höher als die spezifische Aktivität von BT1760. LevB<sub>2286</sub> ist an einen leicht sauren pH-Wert angepasst und zeigte seine maximale Aktivität bei pH 6,2 (Abbildung 40B).



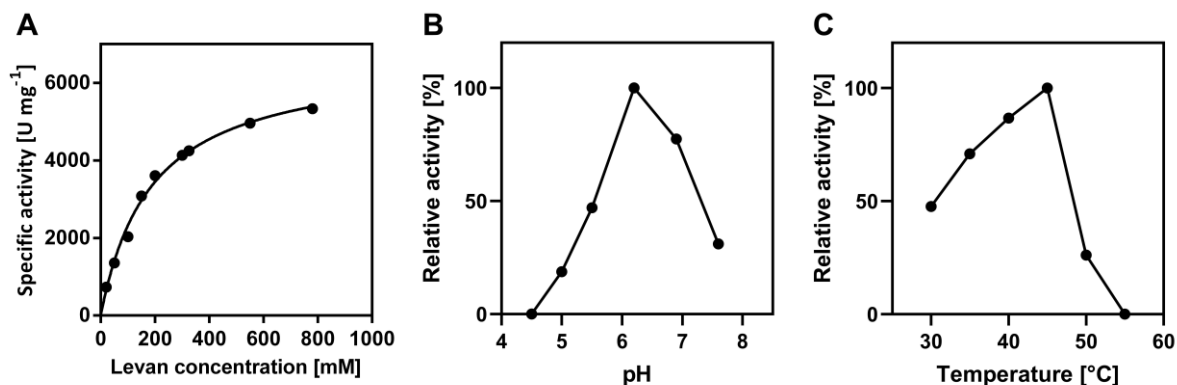


Abbildung 40: Michaelis-Menten-Kinetik (A), pH-Profil (B) und Temperatur-Profil (C) der rekombinanten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286. Das Protein wurde heterolog in *E. coli* NEB5-alpha produziert und mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das pH-Profil wurde unter Verwendung des McIlvaine-Puffer-Systems erstellt. Der Nachweis der Aktivitäten erfolgte mittels Aminphasen-HPLC durch die quantitative Bestimmung der freigesetzten Fruktose-Äquivalente.

Durch die Erstellung eines Temperaturprofils konnte gezeigt werden, dass LevB<sub>2286</sub> die höchste Aktivität bei 45 °C ausübte (Abbildung 40C). Eine rasche Abnahme der Aktivität wurde bei Temperaturen über 45 °C beobachtet, was zu einem totalen Aktivitätsverlust bei 55 °C führte.

### 3.6 Extrakt-basierte Produktion von Levan-artigen Fruktooligosacchariden

Die Untersuchungen zur rekombinanten Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 sowie zur rekombinanten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 konnte zeigen, dass sich beide Proteine effizient heterolog in *E. coli* produzieren lassen. Parallel zur *in-vivo*-Produktion (Kapitel 3.3.2 *G. japonicus* LMG 1417 vs. *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417: Batch-Kultivierung & 3.3.4 Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 und dem erstellten Überexpressionsstamm) und zur Zell-freien Produktion Levan-basierter Fruktane (Kapitel 3.3.5 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417) wurde daher die Produktivität und das Produktspektrum von Prozessen untersucht, bei denen die Enzyme in Form von *E. coli*-Rohzellextrakt zugeführt wurden.

#### 3.6.1 Performance verschiedener Endolevanasen in Extrakt-basierten Assays

Zur Validierung, ob die untersuchten rekombinanten Endolevanasen in Form von Zellextrakt ein ähnliches hydrolytisches Verhalten zeigen wie in aufgereinigter Form, wurde ausgehend von den Stämmen *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levB2286, *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_bt1760 und *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levB\_Blic (Kapitel 2.2.1) Rohextrakt hergestellt. Dafür wurde das in Teil 2.5.1.1 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli* beschriebene Protokoll durchgeführt, jedoch ohne die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Proteine. Als Substrat für den so generierten Extrakt diente Levan, welches mit Hilfe der rekombinanten Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 produziert wurde. Wie die quantitative Darstellung der relativen Hydrolyse-Produkte zeigt, erzeugten die Endolevanasen, eingesetzt in Form von Rohextrakt, ein ähnliches Produktspektrum wie nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung (Abbildung 41). Erneut produzierte die rekombinante Endolevanase aus *A. chroococcum* DSM 2286 ausgehend von bakteriellen

Levan fast ausschließlich FOS mit einem  $DP \geq 3$  (Abbildung 41A). Der relative Anteil der unerwünschten Reaktionsprodukte Fruktose und Levanbiose lag nach Ablauf der enzymatischen Levan-Hydrolyse (50 Minuten) bei 3,5 %.

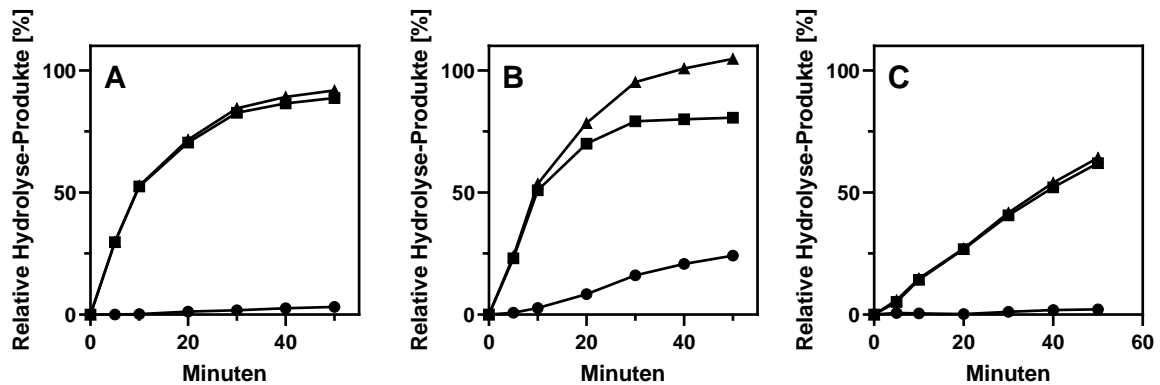


Abbildung 41: Quantitative Darstellung der relativen Hydrolyse-Produkte durch Endolevanase-haltige Zellextrakte von *E. coli* NEB5-alpha. Eingesetzt wurde Zellextrakt der Stämme *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levB2286 (A), *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_bt1760 (B) und *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levB\_Blic (C). Die Hydrolyse-Produkte ( $\blacktriangle$ ) wurden chromatographisch unter Verwendung der Aminex HPX-42A (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland) quantifiziert und unterteilt in Produkte mit einem  $DP \geq 3$  ( $\blacksquare$ ) und  $DP < 3$  ( $\bullet$ ). Für die in den Abbildungsteilen A & B dargestellten Versuche wurden jeweils 10  $\mu$ l Rohextrakt der entsprechenden Stämme beigelegt. Aufgrund der geringen Aktivität von LevB<sub>1</sub> wurden dem im Abbildungsteil C dargestellten Experiment 200  $\mu$ l des entsprechenden Rohextraktes zugesetzt.

Unter Verwendung des BT1760-Zellextraktes konnte erneut die Freisetzung relevanter Fruktose- und Levanbiose-Mengen detektiert werden (Abbildung 41B). Hier lag der Anteil der unerwünschten Produkte mit einem  $DP < 3$  nach 50-minütiger Inkubation bei 23 %. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität der Endolevanase LevB<sub>1</sub> wurde vom entsprechenden Zellextrakt im Vergleich zu den beiden anderen Reaktionen die 20-fache Menge an Extrakt-Volumen eingesetzt. Obwohl durch das Enzym im beobachteten Reaktionszeitraum überwiegend langkettige FOS mit einem  $DP \geq 3$  freigesetzt wurden, konnte keine vollständige Umsetzung des supplementierten Levans erzielt werden. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme, lag unter Verwendung des LevB<sub>1</sub>-Extraktes der relative Fruktose/Levanbiose-Anteil bei 3,4 %. Aufgrund der geringen Aktivität erwies sich die entsprechende Endolevanase jedoch als ungeeignet für eine schnelle Umsetzung von Levan.

### 3.6.2 Produktion von Levan-FOS durch den Einsatz von Levansucrase- und Endolevanase-haltigen Extrakten (2-Stamm-System)

Da die Untersuchungen zu den Endolevanase-haltigen Extrakten (Kapitel 3.6.1 Performance verschiedener Endolevanasen in Extrakt-basierten Assays) erneut die vorteilhaften, hydrolytischen Eigenschaften und die hohe Umsatzgeschwindigkeit der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> bestätigen konnten, wurde in einem nächsten Schritt ein kombinierter Assay erstellt. In diesem sollte durch die simultane Aktivität von Extrakten der Stämme *E. coli* pASK5\_levS1417 und *E. coli* pASK5\_levB2286 in einem einzelnen Reaktionsansatz Saccharose zu Levan-basierter FOS umgesetzt werden. Der

Konzentrationsverlauf des beprobten Assays zeigt, dass die supplementierte Saccharose im innerhalb von drei Stunden nahezu vollständig umgesetzt werden konnte (Abbildung 42).

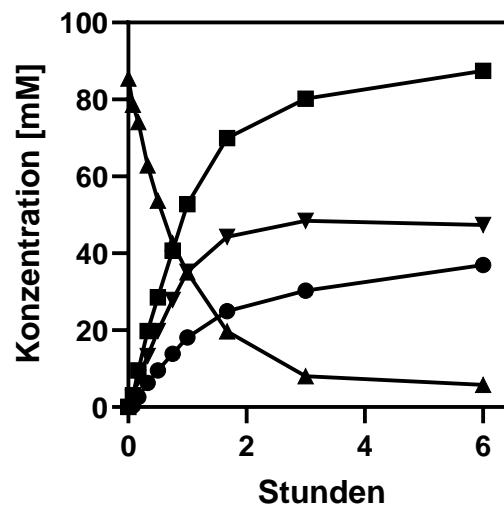


Abbildung 42: Quantitative Darstellung der Umsetzung von Saccharose durch den simultanen Einsatz von LevS1417-haltigem und LevB2286-haltigem Zellextrakt (2-Stamm-System). Die Extrakte wurden ausgehend von den Stämmen *E. coli* pASK5\_levS1417 und *E. coli* pASK5\_levB2286 generiert. Dargestellt sind die diskontinuierlich detektierten Konzentrationen des Substrates Saccharose (▲) sowie der Produkte Glukose (■) und Fruktose (●). Die Konzentration der produzierten FOS mit einem DP  $\geq 3$  (▼) ist in Fruktose-Äquivalenten ausgedrückt. Die Detektion der Produkte erfolgte chromatographisch unter Verwendung der Aminex HPX-42A Trennsäule (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland).

Durch die im Extrakt befindliche Levansucrase LevS1417 wurde die Konzentration des Disaccharids in diesem Zeitraum von initialen 85,5 mM auf 8,1 mM reduziert, was einem relativen Umsatz von 90,5 % entsprach. Die Glukose-Konzentration nahm über die gesamte Reaktion hinweg äquimolar zur Saccharose-Umsetzung zu und lag zum Zeitpunkt der letzten Probennahme bei 87,4 mM. Der relative Anteil an akkumulierter Fruktose lag nach sechs Stunden Inkubation bei 42,2 %. Der verhältnismäßig hohe Anteil an freigesetzter Fruktose lässt sich durch die verhältnismäßig geringe Ausgangskonzentration des Substrates Saccharose erklären. Bei geringen Saccharose-Konzentrationen überwiegt bei Levansucrasen die hydrolytische Aktivität, da aufgrund fehlender Saccharose-Moleküle Wasser als Akzeptor für die Fruktosyl-Einheit des Fruktosyl-Enzym-Intermediates präferiert wird. Steigt die Saccharose-Konzentration kommt es vermehrt zur Transfruktosylierung und der damit verbundenen Übertragung der Fruktosyl-Einheiten auf Saccharose oder die länger werdende Fruktankette (Porrás-Domínguez et al. 2015). Neben den Reaktionsprodukten Glukose und Fruktose konnten mit Hilfe der Aminex HPX-42A Trennsäule mehrere FOS mit einem DP  $\geq 3$  detektiert werden. Die Konzentration der Oligosaccharide erreichte nach drei Stunden Inkubation mit 48,4 mM ihr Maximum. Die Effizienz der FOS Produktion lag unter Verwendung der beiden Rohzellextrakte somit bei 56,6 %. Grundsätzlich bestätigte der chromatographische Nachweis die Funktionalität der simultan eingesetzt Zellextrakte.

### 3.6.3 Produktion von Levan-FOS durch den Einsatz eines Levansucrase- und Endolevanase-haltigen Extraktes (1-Stamm-System)

#### 3.6.3.1 Konstruktion eines 1-Stamm-Systems zur heterologen Produktion von LevS1417 und LevB2286

Um den Prozess der Extrakt-vermittelten Produktion Levan-basierter FOS zu vereinfachen, wurde ein *E. coli* Stamm konstruiert, der zur simultanen Produktion der Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 und der Endolevanase LevB2286 aus *A. chroococcum* DSM 2286 befähigt war. Als Ausgangspunkt für die Klonierung diente das Konstrukt pASK5\_levB2286 welches durch die Restriktionsendonuklease *MscI* linearisiert wurde. Ausgehend vom Plasmid pASK5\_levS1417 wurde ein Fragment mittels Q5 Polymerase amplifiziert, welches das für die Levansucrase LevS1417 kodierende Gen sowie die regulatorischen Elemente des pASK-IBA5 Vektors (Promotor, Operator, RBS, Terminator) enthielt. Durch die Auswahl der Oligonukleotid-Primer LevS/LevB-Assembly\_for und LevS/LevB-Assembly\_rev wurde die amplifizierte Sequenz durch Überhänge erweitert, die homolog zu den Enden des linearisierten Plasmids pASK5\_levB2286 waren. Durch Verwendung des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB; Frankfurt am Main, Deutschland) wurden das linearisierte Plasmid und das amplifizierte PCR-Fragment zu einem zirkulären Plasmid ligiert. Nach Transformation des finalen Konstruktes pASK5\_levS1417\_levB2286 in *E. coli* NEB5-alpha und *E. coli* BL21 wurde die Klonierung und Aufnahme des Plasmids mittels Kolonie-PCR verifiziert. Durch das Primerpaar p5\_levS1417\_for und LevB2286\_pASK5\_rev konnte für beide Stämme eine Fragment vervielfältigt werden, welches der prognostizierten Größe von 3274 bp entsprach (Abbildung 43).

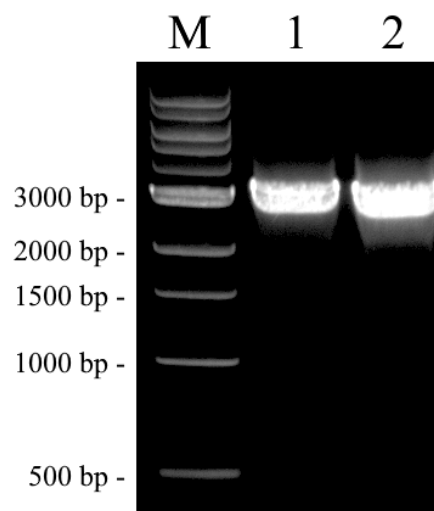


Abbildung 43: UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR zur Verifizierung der Stämme *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417\_levB2286 (1) und *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286 (2). Als Referenzmarker (M) wurde die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

Ausgehend von den bestätigten Transformanten wurde Rohextrakt hergestellt, der die rekombinante Levansucrase LevS1417 und Endolevanase LevB2286 beinhalten sollte. Um die simultane Produktion der

beiden Enzyme zu überprüfen, wurde ein Teil des hergestellten Extraktes mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt und für proteinbiochemische Nachweismethoden eingesetzt. Wie die in Abbildung 44 dargestellte Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Elutionsfraktion zeigt, konnten mit Hilfe des erstellten Plasmids (Abbildung 44A) in *E. coli* zwei Proteine produziert werden, die eine starke Affinität zur Strep-Tactin-Matrix aufwiesen.

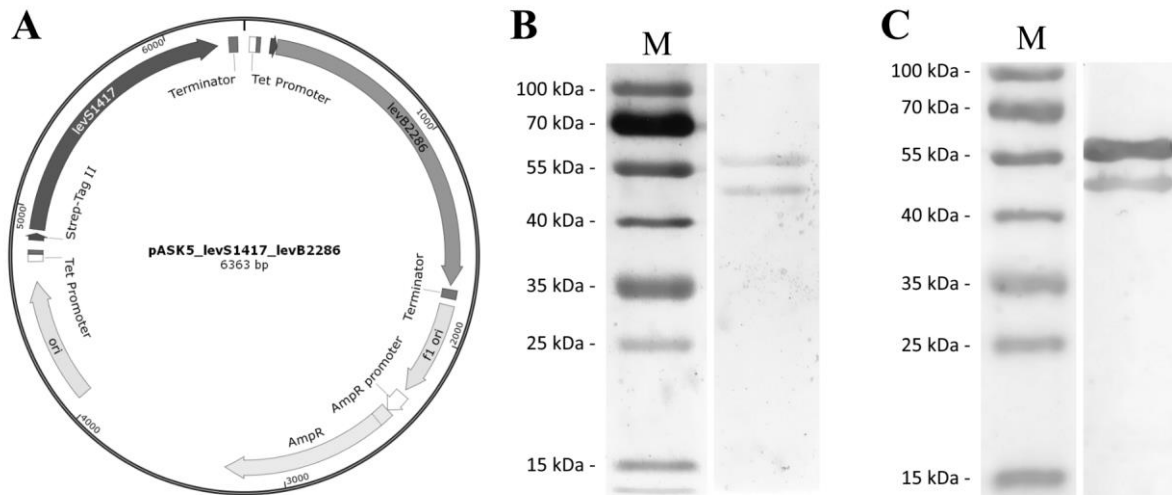


Abbildung 44: Plasmidkarte von pASK5\_levS1417\_levB2286 (A); AmpR, Ampicillin-Resistenzkassette; Tet, Tetracyclin; Affinitätschromatographisch aufgereinigter Zellextrakt von *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286, elektrophoretisch aufgetrennt durch SDS-PAGE und visualisiert durch Silberfärbung (B) und Western Blotting (C). PageRuler™ Als Referenz wurde die Prestained Protein Ladder (M) verwendet.

Zwei Proteinbanden wurden mittels Silberfärbung (Abbildung 44B) und Western Blotting (Abbildung 44C) generiert, die den vorhergesagten Molekulargewichten der Endolevanase (58,7 kDa) und der Levansucrase (51,2 kDa) entsprachen.

### 3.6.3.2 Untersuchung des 1-Stamm-Systems zur Extrakt-basierten FOS-Produktion

Die Funktionalität des hergestellten Extraktes wurde analog zum 2-Stamm-System (Kapitel 3.6.2 Produktion von Levan-FOS durch den Einsatz von Levansucrase- und Endolevanase-haltigen Extrakten (2-Stamm-System)) überprüft. Wie der Konzentrationsverlauf der chromatographisch nachgewiesenen Zucker in Abbildung 45 zeigt, konnten die Extrakte auf Basis von *E. coli* NEB5-alpha und *E. coli* BL21 die supplementierte Saccharose sehr schnell umsetzen. Die Funktionalität der Levansucrase im 1-Stamm-System konnte dadurch bestätigt werden. Der Extrakt auf Basis von *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417\_levB2286 reduzierte die Substratkonzentration innerhalb von 240 Minuten von 2,7 M auf 0,27 M, was einem relativen Umsatz von 90 % entsprach (Abbildung 45A). Die finale Konzentration des unerwünschten Hydrolyse-Produktes Fruktose belief sich nach der vierstündigen Inkubation auf 258,5 mM, was einem relativen Anteil von 10,6 % der aus der Saccharose freigesetzten Fruktose-Einheiten gleichkam. Die simultane Aktivität der rekombinanten Enzyme LevS1417 und LevB2286 generierte eine Gesamt-Ausbeute an FOS mit einem DP  $\geq$  3 von 2,77 M.

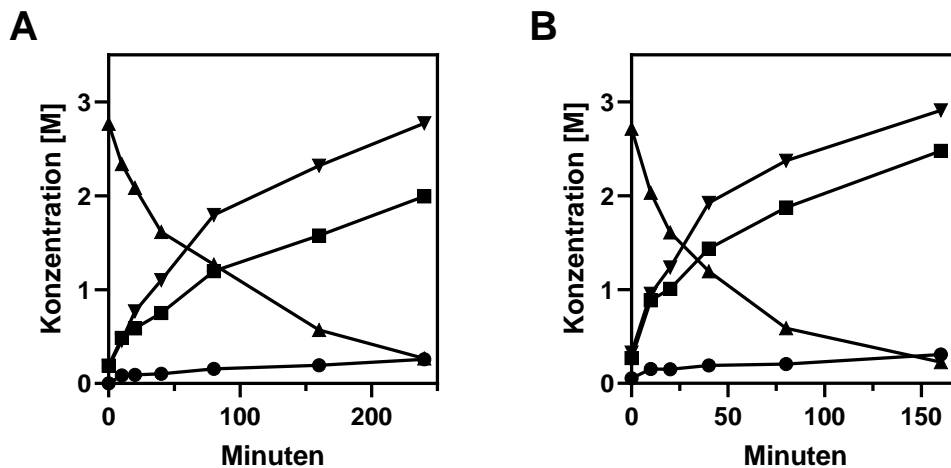


Abbildung 45: Quantitative Darstellung der Umsetzung von Saccharose durch den Einsatz von LevS1417- und LevB2286-haltigem Zellextrakt (1-Stamm-System). Abgebildet sind die Reaktionskinetiken der Extrakte von *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417\_levB2286 (A) und *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286 (B). Die diskontinuierliche Detektion des Substrates Saccharose (▲) sowie der Produkte Glukose (■) und Fruktose (●) erfolgte chromatographisch unter Verwendung der Aminex HPX-42A Trennsäule (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland). Die Konzentration der produzierten FOS mit einem DP  $\geq 3$  (▼) ist in Fruktose-Äquivalenten ausgedrückt.

Der Extrakt auf Basis von *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286 zeigte im direkten Vergleich zur NEB5-alpha Mutante eine noch schnellere Umsetzung der Saccharose (Abbildung 45B). Im entsprechenden Ansatz wurden 91,7 % des Substrates innerhalb von 160 Minuten umgesetzt. Der freigesetzte Fruktose-Anteil lag zu diesem Zeitpunkt bei 12,4 %. Der Ertrag an FOS mit einem DP  $\geq 3$  erreichte nach drei Stunden mit 2,9 M sein Maximum. Bezogen auf das Reaktionsvolumen und das Substrat Saccharose konnte der eingesetzte Extrakt eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $283,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzielen. Die Raum-Zeit-Ausbeute des Extraktes aus Basis von *E. coli* NEB5-alpha belief sich auf  $207,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Einzig durch die Auswahl des Stammes konnte somit der Umsatz der Extrakt-basierter FOS Produktion um 27,8 % gesteigert werden.

Um die Stabilität der rekombinanten Enzyme im produzierten Extrakt zu untersuchen und die eingesetzte Extrakt-Menge zu minimieren, erfolgten weitere Assays, für die der Extrakt-Anteil am Reaktionsvolumen auf  $3,3 \text{ ml L}^{-1}$  Reaktion beziehungsweise  $6,6 \text{ ml L}^{-1}$  Reaktion reduziert wurde. Die Reduktion der Extrakt-Menge führte erwartungsgemäß zu einer Verlängerung der Prozesszeit auf 27 Stunden (Abbildung 46A; Extrakt-Anteil:  $6,6 \text{ ml L}^{-1}$ ) und 55 Stunden (Abbildung 46B; Extrakt-Anteil:  $3,3 \text{ ml L}^{-1}$ ). Innerhalb der Inkubationszeit wurde die Konzentration der supplementierten Saccharose jeweils von  $2,34 \pm 0,01 \text{ M}$  auf  $0,35 \pm 0,1 \text{ M}$  und  $2,49 \pm 0,04 \text{ M}$  auf  $0,26 \pm 0,1 \text{ M}$  reduziert, was einem relativen Umsatz von 85 % und 89,6 % entsprach. In Bezug auf das Reaktionsvolumen und das Substrat Saccharose wurden Raum-Zeit-Ausbeuten von  $25 \text{ g L}^{-1}$  Reaktion beziehungsweise  $13,9 \text{ g L}^{-1}$  Reaktion ermittelt. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme wurden Fruktose-Konzentrationen von  $177,3 \pm 9 \text{ mM}$  beziehungsweise  $173,8 \pm 5,7 \text{ mM}$  detektiert, was einem relativen Verlust von 8,7 % und 7,8 % entsprach.

Die Ausbeute an FOS mit einem  $DP \geq 3$  erreichte unter Verwendung von 6,6 ml Extrakt pro L Reaktionsvolumen nach 27 Stunden Inkubation mit  $2,05 \pm 0,07$  M ein Maximum.

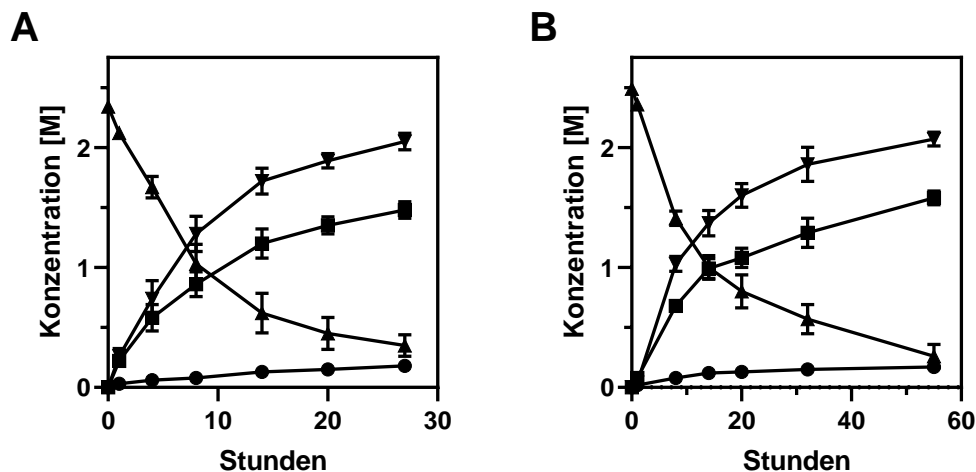


Abbildung 46: Quantitative Darstellung der Umsetzung von Saccharose durch den Einsatz verringerter Mengen von LevS1417- und LevB2286-haltigem Zellextrakt (1-Stamm-System). Abgebildet sind die Reaktionskinetiken des Extraktes von *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286. Die diskontinuierliche Detektion des Substrates Saccharose (▲) sowie der Produkte Glukose (■) und Fruktose (●) erfolgte chromatographisch unter Verwendung der Aminex HPX-42A Trennsäule (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland). Die Konzentration der produzierten FOS mit einem  $DP \geq 3$  (▼) ist in Fruktose-Äquivalenten ausgedrückt. Das Experiment wurde als technisches Triplikat durchgeführt.

Bei verringertem Extrakt-Volumen (3,3 ml Extrakt pro L Reaktion) wurde das Konzentrationsmaximum der FOS mit einem  $DP \geq 3$  nach 55 Stunden gemessen. Die Ausbeute lag in diesem Fall bei  $2,07 \pm 0,06$  M.

### 3.6.3.3 Up-Scaling der Extrakt-basierten Levan-FOS-Produktion

Um die Skalierbarkeit des entwickelten, Extrakt-basierten Systems zu untersuchen, erfolgte ein Up-Scaling des beschriebenen Prozesses auf 500 ml. Dafür wurde erneut Extrakt auf Basis des Stammes *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286 hergestellt und zu einer entsprechenden Prozesslösung zugeführt. Nach dem Einleiten der enzymatischen Reaktion durch die Zugabe des Rohextrakts wurde eine rapide Abnahme der Saccharose-Konzentration beobachtet (Abbildung 47). Innerhalb der 48-stündigen Inkubation wurde die Substrat-Konzentration von  $809,6 \pm 1,3$  auf  $127 \pm 0,7$  g L<sup>-1</sup> reduziert, was einem relativen Umsatz von 84,3 % entsprach. Durch den optimierten, chromatographischen Nachweis (Kapitel 3.4.2) konnten die HPLC-Analysen im Rahmen der überwachten Reaktion offenbaren, dass das bi-enzymatische System FOS der Formel GF<sub>n</sub> und F<sub>n</sub> produzierte, wobei n den Grad der polymerisierten intramolekularen Fruktosyl-Einheiten angibt. Mit finalen Ausbeuten von  $105,8 \pm 1$  und  $78,5 \pm 4$  g L<sup>-1</sup> waren 6-Kestose und 6-Nystose die am häufigsten vorkommenden Fruktosylierungsprodukte der Reaktion. Die Gesamtausbeute von β-2,6-FOS auf Basis des Akzeptors 6-Kestose betrug  $199,9 \pm 8,4$  g L<sup>-1</sup>. Darüber hinaus wurden aus dem Trisaccharid 1-Kestose aufbauende FOS mit einer kombinierten Ausbeute von  $91,8 \pm 5,6$  g L<sup>-1</sup> nachgewiesen. Durch den

chromatographischen Vergleich mit den Inulin-FOS 1,1-Kestotetraose und 1,1,1-Kestopentaose wurde ausgeschlossen, dass die von 1-Kestose abgeleiteten FOS  $\beta$ -2,1-FOS waren.

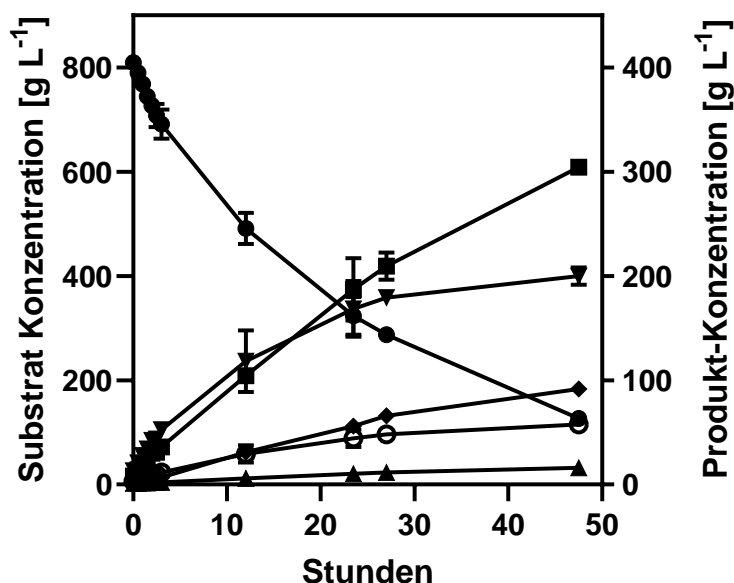


Abbildung 47: Up-Scaling der Extrakt-basierten FOS Produktion. Der Start der Reaktion, die im 500-ml-Maßstab durchgeführt wurde, erfolgte durch die Zugabe von Zellextrakt des Stammes *E. coli* BL21 pASK5\_levS1417\_levB2286. Die diskontinuierliche Detektion des Substrates Saccharose (●) sowie der Produkte Glukose (■), Fruktose (▲), 6K-FOS (▼), 1K-FOS (◆) und L-FOS (○) erfolgte chromatographisch unter Verwendung der Eurospher II 100-3 NH<sub>2</sub>, 250 x 3 Aminophasen Trennsäule (Knauer; Berlin, Deutschland). Das Experiment wurde als Duplikat durchgeführt.

Wahrscheinlich handelte es sich stattdessen um 1K-FOS, die Produkte des Fruktosyltransfers an Position 6 des terminalen Fruktosylanteils der 1-Kestose darstellen und daher interne  $\beta$ -2,6-verknüpfte Fruktosylanteile enthalten (Raga-Carbajal, López-Munguía, Alvarez, & Olvera, 2018). L-FOS ohne terminale Glukose-Einheiten wurden mit einer kombinierten Ausbeute von  $57,6 \pm 3,2 \text{ g L}^{-1}$  nachgewiesen, was die Funktionalität der Endolevanase im skalierbaren Prozess belegte. Die Aktivität von LevB<sub>2286</sub> bewirkte zusätzlich, dass die Viskosität der Prozesslösung nicht zunahm, was ein Downstream-Processing drastisch erleichtern könnte. Am Ende der 48-stündigen Inkubation betrug die Ausbeute an FOS mit internen  $\beta$ -2,6-Fruktosylresten  $319,9 \pm 16,6 \text{ g L}^{-1}$ . Von den aus dem Substrat Saccharose freigesetzten Fruktose-Einheiten wurden zu diesem Zeitpunkt nur  $15,9 \pm 2,5 \text{ g L}^{-1}$  in Form von freier Fruktose detektiert. Dies entsprach einem relativen Verlust von 5,2 %.

### 3.6.4 Optimierung der Extrakt-basierten FOS-Produktion

Ein essentieller Faktor für eine großtechnische Produktion von Fruktooligosacchariden ist die möglichst hohe Produktion der rekombinanten Proteine, um die Raum-Zeit-Ausbeuten eines entsprechenden Produktionsprozesses zu maximieren. Obwohl die heterologe Produktion auf Basis des kommerziellen pASK-IBA5 Vektors bereits hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein erzielte, sollte die Extrakt-Produktion weiter optimiert werden. Sowohl die Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 als auch die Endolevanase aus *A. chroococcum* DSM 2286 ließen sich Plasmid-vermittelt effizient in *E. coli*



produzieren. Durch Transformation des Plasmides in *E. coli* BL21 konnte die Raum-Zeit-Ausbeute der Produktion deutlich gesteigert werden (Abbildung 45). Eine nähere Untersuchung der regulatorischen Elemente des pASK-IBA5 Vektors offenbarte jedoch weitere Optimierungsmöglichkeiten. So wich die Sequenz der Vektor-kodierten Ribosomen-Bindestelle (RBS) deutlich von Sequenzen ab, die nachweislich eine starke Translationsinitiation vermitteln. In der Regel zeichnet sich der Bereich stromaufwärts des Start-Codons durch eine Adenosin- und Guanin-reiche Sequenz aus, die durch einen Spacer von 5-8 Nukleotiden vom Start-Codon getrennt wird. Die Studie von Ringquist *et al.* konnte beweisen, dass die RBS-Sequenz „AGGAGG“, die über acht Adenosin-Nukleotide vom Start-Codon getrennt wird, maximale Ausbeuten der  $\beta$ -Glukosidase LacZ in *E. coli* vermittelt (Ringquist *et al.* 1992). In dem in Abbildung 48 markierten roten Bereich, der beispielhaft die 5-UTR des pASK-IBA5 Vektors zeigt, konnte solch eine Sequenz nicht identifiziert werden.

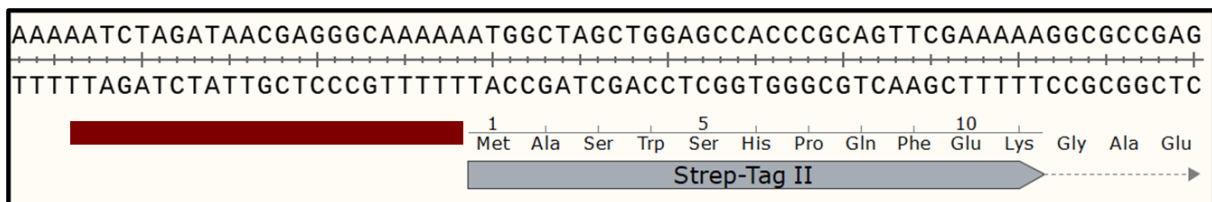


Abbildung 48: Ausschnitt des kommerziellen pASK-IBA5-Vektors mit markierter RBS- und Spacer-Region (rot).

Um die Ausbeuten der Plasmid-vermittelten Protein-Produktionen in *E. coli* zu steigern, wurden daher die RBS- und Spacer-Bereiche der Plasmide pASK5\_levS1417 und pASK5\_levB2286 durch gerichtete Mutagenese modifiziert. Die Mutagenese erfolgte durch Verwendung des Q5SDM-Kits der Firma NEB (Frankfurt a. M., Deutschland) unter Verwendung des Primer-Paars pASK5\_optRBS\_for und pASK5\_optRBS\_rev. Da die Primer nicht mit dem inserierten DNA-Fragment, sondern ausschließlich mit Vektorbereichen hybridisierten, konnten die Mutagenese-Primer für beide Plasmide genutzt werden. Nach Abschluss des Mutagenese-Protokolls und anschließender Transformation der modifizierten Plasmide in *E. coli* NEB5-alpha, wurden entsprechende Transformanten durch Kolonie-PCR verifiziert.

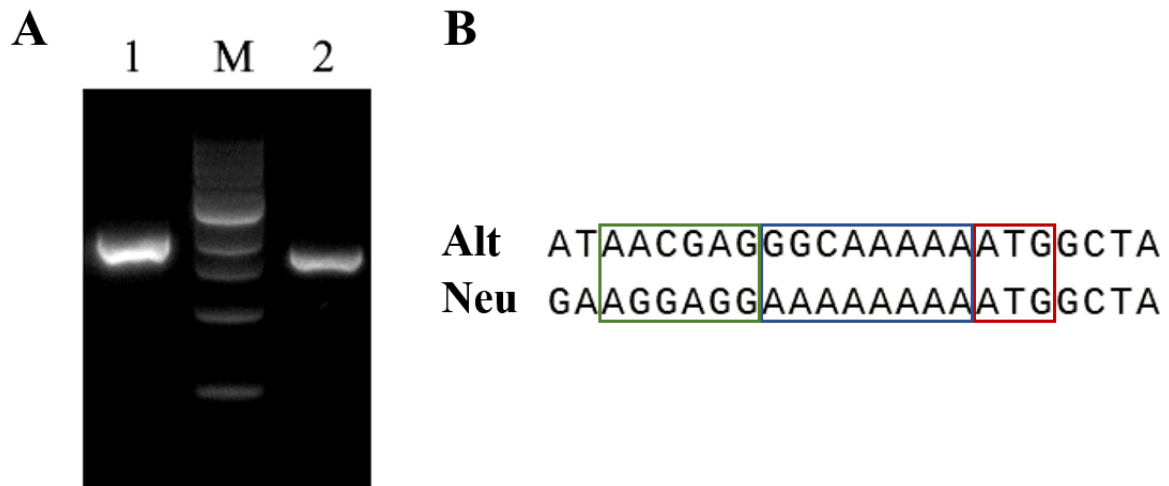


Abbildung 49: UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR (A) zur Verifizierung der Stämme *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_optRBS\_levB2286\_oSP (1) und *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_optRBS\_levS1417 (2) und Vergleich (B) der optimierten RBS-Sequenz mit dem originalen RBS-Bereich des pASK-IBA5-Vektors (IBA GmbH; Göttingen, Deutschland). Dargestellt sind die RBS (Grün), der Spacer (Blau) sowie das Start-Codon (Rot). Als Referenzmarker (M) für die Gelelektrophorese wurde die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

Durch Verwendung des Primer-Paars pASK\_for und pASK\_rev konnten in entsprechenden Klonen Fragmente amplifiziert werden, die den prognostizierten Größen von 1803 bp (pASK5\_optRBS\_levB2286) und 1586 bp (pASK5\_optRBS\_levS1417) entsprachen (Abbildung 49A). Mittels Sequenzierung konnte in den entsprechenden Klonen das Vorhandensein der modifizierten RBS nachgewiesen werden (Abbildung 49B). Die bestätigten *E. coli* NEB5-alpha-Transformanten wurden analog zu den Stämmen ohne optimierter RBS für die Produktion der rekombinanten Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> eingesetzt. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung der Strep-Tag gekoppelten Proteine aus den Zellextrakten wurden die Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen nach Bradford bestimmt und verglichen (Abbildung 50).

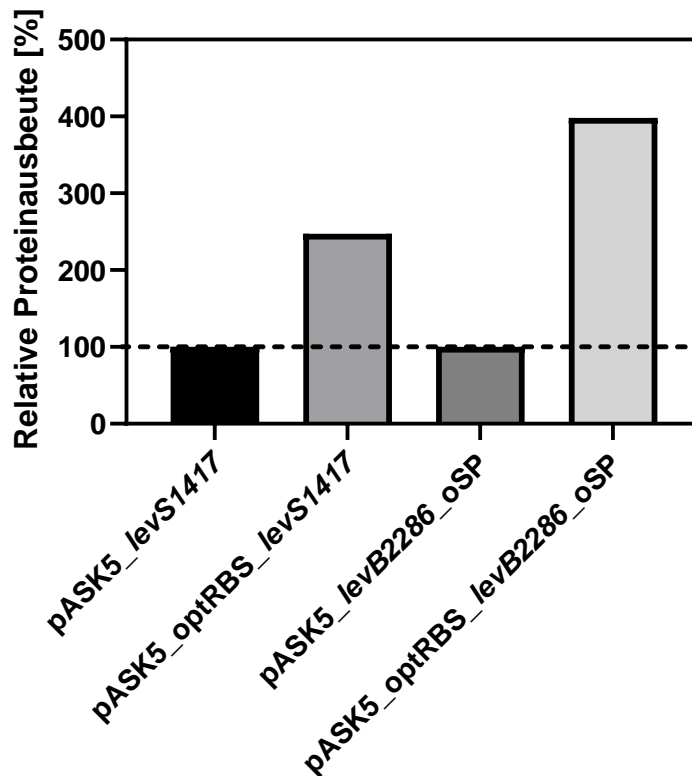


Abbildung 50: Relative Proteinausbeuten von nativen pASK5-Derivaten und Derivaten mit optimierter Ribosomenbindestelle. Die Plasmid-vermittelte Produktion der Levansucrase LevS1417 und der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> erfolgte in *E. coli* NEB5-alpha. Die Quantifizierung der Proteinausbeuten erfolgte nach Bradford im Anschluss an die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus dem Zellextrakt.

Die Modifikation der RBS in den pASK5-Derivaten pASK5\_levS1417 und pASK5\_levB2286 führte zu deutlich höheren Proteinausbeuten bei den entsprechenden Produktionen. Unter Verwendung der optimierten RBS konnte der Ertrag an rekombinanter Levansucrase um den Faktor 2,5 von 4,1 mg auf 10,1 mg pro L Kultur gesteigert werden. Der Effekt der Optimierung war im Fall des Endolevanase-kodierenden Konstruktes nochmals größer. Dort wurde der Ertrag an rekombinantem Protein durch die Modifikation der RBS um den Faktor 4 von 3,6 mg auf 14,3 mg pro L Kultur erhöht.

### 3.6.5 Integration der Levansucrase- und Endolevanase-kodierenden Gene in das Genom von *E. coli* BW25113

Neben der Plasmid-vermittelten Produktion von rekombinanten Proteinen konnte sich in industriellen Verfahren auch die genomische Integration von codierenden Nukleotidsequenzen etablieren. Die genomische Integration gewährleistet eine stabile Expression entsprechender Gene ohne die Zugabe von Antibiotika zur Aufrechterhaltung der Plasmid-Stabilität. Durch die Verwendung eines konstitutiven Promotors kann zusätzlich die Zugabe von Induktoren wie IPTG oder AHT umgangen werden. Um diese Vorteile für die entwickelte Extrakt-basierte FOS-Produktion anzuwenden, sollte eine genomische Integration der Levansucrase- und Endolevanase-kodierenden Gene in das Genom von *E. coli* BW25113 erfolgen. Die Integration der Gene *levS1417* und *levB2286* in das Genom von *E. coli* BW25113 wurde durch die von Bassalo *et al.* etablierte Methode auf Basis von CRISPR-Cas9 durchgeführt (Bassalo et

al. 2016). Unter Verwendung des Plasmids pSS9 führt diese Methode zur Integration des GFP-Gens in den SS9-Lokus im Genom von *E. coli* BW25113. Für die beabsichtigte Integration sollte zunächst die für GFP kodierende Nukleotidsequenz durch die Gene *levSI417* und *levB2286* substituiert werden. Zeitgleich erfolgte die Co-Transformation der Plasmide pX2\_Cas9 und pSIM5 in *E. coli* BW25113 mittels Elektroporation. Wie Abbildung 51A zeigt, konnte mittels Kolonie-PCR die Aufnahme der Basis-Plasmide pX2\_Cas9 und pSIM5 durch *E. coli* BW25113 verifiziert werden. Unter Verwendung der Primer-Paare pX2\_screen\_f und pX2\_screen\_r sowie pSIM5\_screen\_f und pSIM5\_screen\_r wurden für einen Klon in den durchgeführten Screenings zwei Banden generiert. Diese entsprachen den prognostizierten Größen von 1335 bp (pX2\_Cas9) und 1041 bp (pSIM5). Die parallel durchgeführte Substitution des GFP-Gens gelang nur für das Gen *levSI417*. Die im Anschluss an die Transformation des Konstruktes pSS9\_optRBS\_levSI417 durchgeführte Kolonie-PCR führte zur Amplifizierung eines Fragmentes, welches der prognostizierten Größe von 3273 bp entsprach (Abbildung 51B).

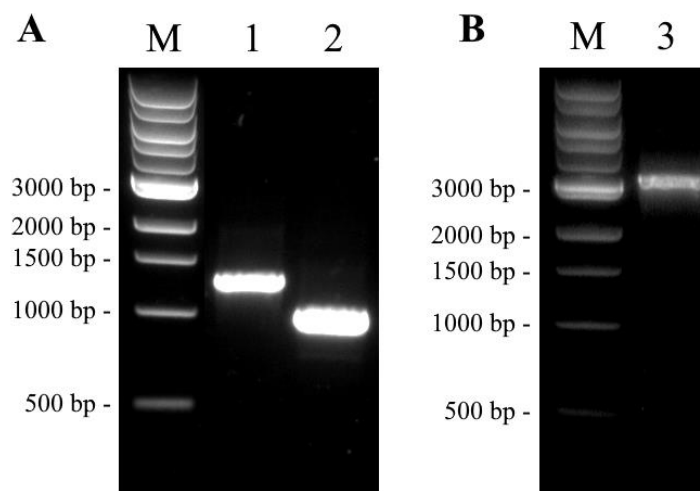


Abbildung 51: UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR zur Verifizierung der Stämme *E. coli* BW25113 pX2\_Cas9 / pSIM5 (A) und *E. coli* NEB5-alpha pSS9\_optRBS\_levSI417 (B). Der erstgenannte Stamm wurde durch zwei separate PCR-Reaktionen auf das Vorhandensein der Plasmide pX2\_Cas9 (Lane 1) und pSIM5 (Lane 2) gescreent. Als Referenzmarker (M) wurde die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

Im Falle der *levB2286*-Substitution konnten auch unter Anwendung alternativer Klonierungsstrategien keine positiven Transformanten generiert werden.

Durch eine zweite Co-Transformation sollte dann durch die simultane Elektroporation der Plasmide SS9\_RNA und pSS9\_optRBS\_levSI417 die Cas9-Maschinerie komplettiert und ein Doppelstrangbruch im SS9-Lokus des Transformanten-Genoms induziert werden. Nachweislich ermöglicht dieser Locus eine starke Expression kodierender DNA-Sequenzen (Bassalo et al. 2016). Durch die Rekombinase-vermittelte Reparatur des DNA-Bruchs und die damit verbundene Insertion des Gens *levSI417* sowie der optimierten regulatorischen Elemente, sollte die finale, genomische Integrationsmutante generiert werden. Nach Durchführung des Integrationsprotokolls (Kapitel 2.4.10 Genomische Integration in *E. coli* BW 25113) wurden Kolonien, die auf selektiven LB<sub>Amp</sub>-Platten wuchsen, durch das Primer-Paar

SS9\_genomic\_for und SS9\_genomic\_rev auf die Insertion der gewünschten Sequenz überprüft (Abbildung 52).

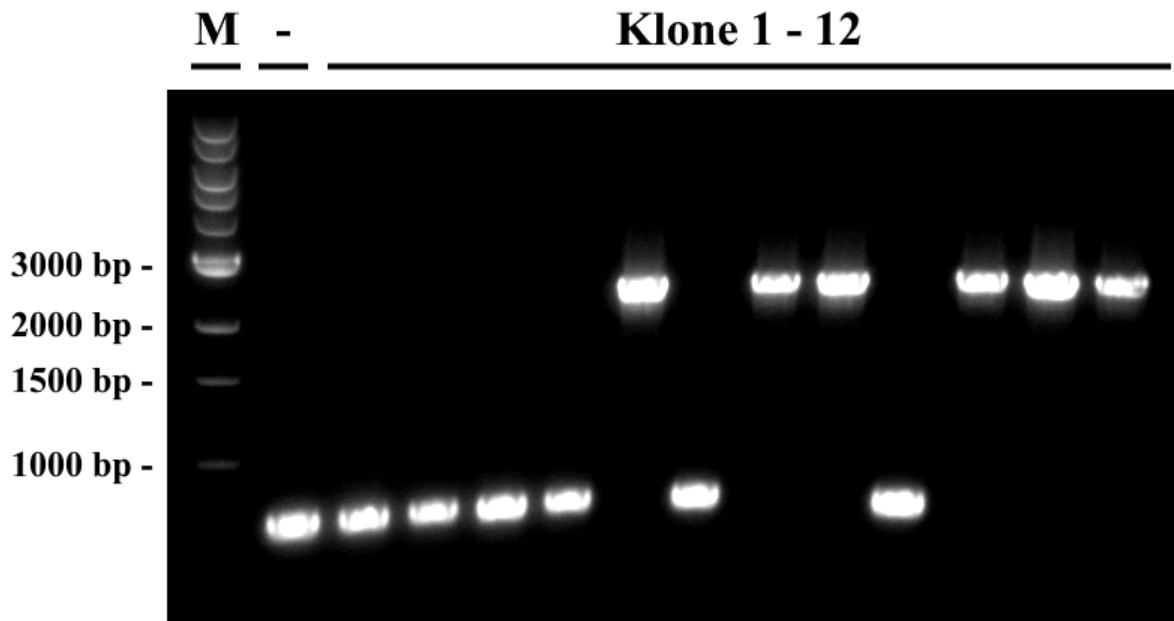


Abbildung 52: UV-Durchlicht-Aufnahme der elektrophoretisch aufgetrennten Kolonie-PCR zur Verifizierung des Stammes *E. coli* BW25113 SS9::*levS1417*. Als Referenzmarker (M) wurde die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

Wie die UV-Durchlicht-Aufnahme der aufgetrennten Kolonie-PCR-Fragmente zeigt, wurde bei sechs der zwölf gepickten Klone die prognostizierte Bandengröße von 2547 bp erzeugt. Mit einer Effizienz von 50 % konnte somit die für die Levansucrase *LevS1417* kodierende Nukleotidsequenz zusammen mit der optimierten RBS-/Spacer-Region in den SS9-Lokus von *E. coli* BW25113 integriert werden. Die Funktionalität der Genom-Integrierte wurde ebenfalls durch Verwendung von Roh-Zellextrakt getestet. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich mit dem Plasmid-tragenden Stamm *E. coli* BL21 pASK5\_optRBS\_*levS1417* ebenfalls eine Zunahme der Viskosität der angesetzten Reaktionslösung, was auf die Produktion von polymerem Levan hindeutete (nicht dargestellt). Die Viskositätssteigerung verlief jedoch deutlich langsamer als beim Plasmid-basierten Extrakt, was sich durch die geringere mRNA-Zahl begründet lässt, die bei der Integration von codierenden Nukleotid-Sequenzen in das Genom von Bakterien erzeugt wird. Trotz der geringeren Aktivität des Extraktes wurde die Funktionalität der Genom-Integrierte bestätigt, sodass multiple Integrationen der Levansucrase-codierenden DNA vergleichbare Aktivitäten zu den Plasmid-basierten System erzielen könnten.

## 4. Diskussion

Das präbiotische Konzept, das im Jahre 1995 durch Glenn R. Gibson und Marcel B. Roberfroid eingeführt wurde (Gibson & Roberfroid 1995), ist fundamental für das Verständnis der humanen Mikrobiota. Die Möglichkeit, die Zusammensetzung mikrobieller Populationen in Kompartimenten wie dem Darm oder der Haut gezielt zu modulieren, gewährt zahlreiche Ansatzpunkte zur Verbesserung der menschlichen Gesundheit. Die selektive Manipulation der Mikrobiota kann darüber hinaus für therapeutische Zwecke eingesetzt werden, um zahlreiche Krankheiten zu behandeln (Markowiak & Ślizewska 2017). Innerhalb der vergangenen 25 Jahre wurde das präbiotische Konzept stetig weiterentwickelt, da der technische Fortschritt im Bereich der Hochdurchsatz-Sequenzierung neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung der humanen Mikrobiota ermöglichte. Zusätzlich trug dieser Fortschritt auch zur Identifikation neuer Substanzen bei, die die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota vorteilhaft modulieren können. Zu diesen Substanzen zählen auch das  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktan-Polymer Levan sowie Levan-basierte Fruktooligosaccharide.

Strikte Kriterien müssen erfüllt werden, damit eine Verbindung als Präbiotikum klassifiziert werden darf (Gibson et al. 2017), was dazu geführt hat, dass nur eine enge Auswahl nicht verdaulicher Lebensmittelbestandteile diesen Status bis dato erreichen konnte. Eine Evaluierung neuartiger, präbiotischer Kandidaten gestaltet sich aufgrund fehlender Produktionsprozesse und der damit einhergehenden geringen oder nicht vorhandenen kommerziellen Verfügbarkeit schwierig. Das Interesse an ertragreichen, Zeit- und Kostengünstigen Produktionsstrategien für präbiotische Substanzen ist daher groß.

In dieser Arbeit sollte daher ein effizientes Verfahren zur Produktion Levan-basierter Fruktooligosaccharide entwickelt werden.

### 4.1 Identifizierung eines geeigneten Levan-Produzenten

Wie im einleitenden Teil dieser Arbeit erwähnt wurde, wird der präbiotische Markt durch Inulin und Inulin-basierte FOS dominiert. Im Jahr 2015 wurden 38,1 % des weltweit erzielten Präbiotika-Marktumsatzes durch den Verkauf von Fruktanen des Inulin-Typs erwirtschaftet (Balthazar et al. 2016). Die Aufreinigung  $\beta$ -2,1-glykosidisch verknüpfter Fruktane aus pflanzlichem Material unterliegt jedoch gewissen Limitierungen, die sich negativ auf die Produktstabilität auswirken. Faktoren wie Anbau, Erntezeitpunkt und Lagerbedingungen nach der Ernte führen zu einer hohen Variabilität im DP von pflanzlich extrahiertem Inulin (Cabezas et al. 2002; Saengthongpinit & Sajjaanantakul 2005; Li et al. 2015b). Diese Variabilität wirkt sich auch auf die angesprochene Modulation der humanen Mikrobiota aus, da die Kettenlänge präbiotischer Inulin-Präparationen großen Einfluss darauf nimmt, welche Mikroorganismen selektiv in ihrem Wachstum gefördert werden (Gibson & Wang 1994; Roberfroid et al. 1998; Rossi et al. 2005; Van De Wiele et al. 2007). In kontinuierlichen Kultivierungsexperimenten zeigte sich bei der Zugabe von Inulin-basierten Oligofruktosen ein bifidogener Effekt, nicht aber bei der

Supplementation von Glukose oder langkettigem Inulin (Gibson & Wang 1994). Roberfroid *et al.* bestätigten die Tendenz, dass kurzkettige FOS das Wachstum von Bifidobakterien stärker fördert als langkettiges Inulin. Die Autoren verifizierten zusätzlich, dass Bifidobakterien schneller auf FOS wachsen als andere, repräsentative Vertreter der intestinalen Mikrobiota (Roberfroid *et al.* 1998). Eines der wohl umfassendsten Screenings zur Evaluation des bifidogenen Effekts von Inulin-Fruktanen wurde von Rossi *et al.* durchgeführt. Die Wissenschaftler kultivierten über 50 *Bifidobacterium* Stämme auf Inulin-FOS und polymerem Inulin und zeigten, dass nahezu alle Stämme auf FOS, nicht aber auf polymerem Inulin Wachstum zeigten (Rossi *et al.* 2005). Konträre Ergebnisse lieferten van de Wiele *et al.*, die die präbiotische Wirkung von Inulin-Präparaten unter Verwendung des SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) untersuchten. Der SHIME ist eines der wenigen Darmmodelle, das den gesamten Gastrointestinaltrakt inklusive Magen, Dünndarm und verschiedenen Dickdarmregionen nachahmt (van de Wiele *et al.* 2015). Die Forscher deckten auf, dass im SHIME durch Inulin-Zugabe die Konzentration an SCFAs und die Zahl an Bifidobakterien stärker zunahm als durch Zugabe von Oligofruktose (Van De Wiele *et al.* 2007). Zusätzlich resultierte der Oligofruktose-Feed in einer erhöhten Ammonium-Konzentration, was auf proteolytische Bedingungen im SHIME hindeutet, die wiederum die Tumorgenese fördern können (Ichikawa & Sakata 1998). Die erwähnten Publikationen unterstreichen die Bedeutung des Polymerisierungsgrades für den präbiotischen Effekt entsprechender Fruktan-Präparationen und deuten zugleich daraufhin, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um den Einfluss der Kettenlänge auf gesundheitsfördernde Bakterien im menschlichen Darm einzuordnen.

Alternative Produktionsstrategien auf Basis mikrobieller Prozesse könnten in diesem Zusammenhang ein einheitliches Produktspektrum mit definierten Kettenlängen gewährleisten. Im Gegensatz zu agrarwirtschaftlichen Prozessen bieten biotechnologische Prozesse kontrollierbarere Bedingungen und werden nicht von abiotischen Faktoren beeinflusst. Diese Vorteile werden bereits genutzt, um Inulin-FOS in industriellem Maßstab mit Hilfe mikrobieller Fruktosyl-Transferasen zu produzieren (Nobre *et al.* 2015).

#### **4.1.1 *Gluconobacter* sp. – Plattform für die Levanproduktion**

Die Produktion des extrazellulären Polysaccharids Levan konnte innerhalb des prokaryotischen Reichs bei Vertretern zahlreicher Gattungen beobachtet werden. Prominente Beispiele gram-positiver Levan-Produzenten sind Arten der Gattungen *Bacillus* (Shih *et al.* 2010; Dos Santos *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; Abou-taleb *et al.* 2015; Kekez *et al.* 2015) und *Paenibacillus* (Han & Clarke 1990; Liu *et al.* 2012; Liang & Wang 2015). Die Synthese von Levan, die auch in gram-positiven Milchsäurebakterien der Gattungen *Streptococcus*, *Leuconostoc* und *Lactobacillus* beobachten werden konnte, (Rathsam & Jacques 1998; Van Geel-Schutten *et al.* 1999; Olvera *et al.* 2007), wird auch von gram-negativen Mikroorganismen ausgeführt. Essigsäurebakterien der Gattungen *Gluconacetobacter* (Hernández *et al.* 1999; Kornmann *et al.* 2003; Molinari & Boiardi 2013) und *Gluconobacter* (Jakob *et al.* 2012; Ua-Arak

et al. 2017), der halophile Organismus *Halomonas* sp. (Poli et al. 2009; Poli et al. 2013) sowie *Zymomonas mobilis* (Dawes et al. 1966; Calazans et al. 2000; Bekers et al. 2002) konnten als Levan-Produzenten identifiziert werden.

In seiner Doktorarbeit machte Dr. Konrad Kosciow die Beobachtung, dass das Essigsäurebakterium *G. japonicus* LMG 1417 auf Saccharose-haltigen Agarplatten eine extrem schleimige Kolonien-Morphologie ausbildete (Kosciow, 2017). Diese Beobachtung, die auf die Produktion des extrazellulären Polysaccharids Levan hindeutete, diente als Ansatzpunkt für die vorliegende Dissertation, in der eine effiziente Produktionsstrategie für Levan-basierte FOS entwickelt werden sollte.

Zusätzlich zu dem untersuchten Organismus *G. japonicus* LMG 1417 (Kosciow 2017) wurden in dieser Arbeit fünf weitere Vertreter der Gattung *Gluconobacter* auf die Produktion des vielversprechenden Polysaccharids Levan gescreent (Kapitel 3.1). Die Produktion von extrazellulären Polysacchariden dient zahlreichen Mikroorganismen als Schutzmechanismus, um sich gegen umweltbedingte Stressfaktoren wie Austrocknung oder osmotischen Druck zu schützen (Velázquez-Hernández et al. 2011). Ferner können EPS als Nährstoffspeicher assimiliert werden, die Ausbildung von Biofilmen unterstützen oder als Virulenzfaktor während der Kolonisierung eines Wirtsorganismus dienen (Velázquez-Hernández et al. 2009). Insgesamt drei der sechs untersuchten Organismen zeigten auf Saccharose-haltigen Agarplatten die Ausbildung schleimiger Kolonien, was auf die Produktion eines EPS hindeutete (Abbildung 4). Die extreme Mucus-Produktion durch *G. japonicus* LMG 1417, die von Dr. Kosciow beobachtet wurde, konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Zwecks Identifizierung des gebildeten EPS, wurde aus Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417 isoliertes Präzipitat mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR- und FTIR-Spektroskopie analysiert. Beide Verfahren konnten bestätigen, dass es sich bei dem Präzipitat um das  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktan-Polymer Levan handelte (Kapitel 3.1.2). Der interne Vergleich mit dem kommerziellen Levan-Standard, der mit Hilfe von *E. herbicola* produziert wurde, zeigte, dass die Fruktan-Präparationen in beiden analytischen Verfahren nahezu identische Verschiebungen erzeugten. Darüber hinaus konnte der Vergleich der detektierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungen mit Literaturwerten die Produktion von Levan durch *G. japonicus* LMG 1417 zusätzlich verifizieren. Eine valide Datengrundlage lieferte in diesem Zusammenhang die Publikation von Jakob *et al.* (2013). Die Forscher der Technischen Universität München unterzogen insgesamt vier Fruktane, die von verschiedenen Essigsäurebakterien produziert wurden, einer detaillierten, strukturellen Analyse. Ein Vergleich mit den von Jakob *et al.* generierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungen untermauerte den Befund, dass es sich bei dem durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten EPS um Levan handelte (Tabelle 27). Neben den insgesamt sechs Resonanzsignalen, die den sechs Kohlenstoff-Atomen der monomeren Levan-Untereinheit Fruktose zugeordnet werden konnten, wurden in der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse zwei weitere Signale erzeugt. Durch einen Literaturvergleich wurden diese Signale als Ethanol identifiziert, was auf eine unvollständige Trocknung des präzipitierten Materials hindeutete (Gottlieb et al. 1997). Die Methode der Lufttrocknung erwies sich daher als ungeeignet für die



Aufbereitung des ausgefällten Polymers. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ausgefälltes Material daher zunächst in  $\text{H}_2\text{O}_r$  aufgenommen, dialysiert, bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  weggefroren und mittels Lyophilisation gefriergetrocknet. Dieses Verfahren, das sich das physikalische Prinzip der Sublimation zu Nutze macht, eignet sich im Labormaßstab ideal für die vollständige Trocknung sensibler Substanzen (Arndt 2017). Dafür wird tiefgefrorenes Material einem Vakuum ausgesetzt, wodurch das im Produkt enthaltene Wasser unter dem Gefrierpunkt sublimiert. Der hohe Dampfdruck von Wasser im gefrorenen Aggregatzustand ermöglicht den direkten Übergang in den gasförmigen Aggregatzustand. Durch die zusätzliche Zufuhr von Wärme kann der Wassergehalt im Lyophilisat auf bis zu 1 % gesenkt werden.

Neben der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie wurde auch die FTIR-Spektroskopie für die Identifizierung des durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten EPS eingesetzt. Dieses Verfahren beruht auf dem physikalischen Phänomen, dass die meisten Moleküle Licht im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums absorbieren und die absorbierte Energie in Molekülschwingungen umwandeln (Dutta 2017). Substanzspezifisch wird so ein einzigartiger, molekularer Fingerabdruck generiert, der die Identifizierung unbekannter Verbindungen ermöglicht. Ähnlich wie bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analytik zeigten die FTIR-Verschiebungen des durch *G. japonicus* LMG 1417 produzierten EPS hohe Übereinstimmungen zu den Verschiebungen des Referenz-Levans aus *E. herbicola* (Abbildung 6). Dieses Verfahren konnte somit die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen untermauern. Im direkten Vergleich mit den Daten von Barone und Medynets (2007) zeigten sich geringe Abweichungen zu den Verschiebungen der „Carbohydrate-Fingerprint“-Region. In dem Bereich zwischen  $800 - 1400\text{ cm}^{-1}$  erzeugen Kohlenhydrate ein Struktur-spezifisches Signalmuster, bei dem die Position und die Intensität der Signale von Substanz zu Substanz variiert (Filippov 1992). Die Abweichungen im direkten Vergleich mit Barone und Medynets (2007) könnten darin begründet sein, dass die Wissenschaftler kein gereinigtes Levan für ihre Messungen eingesetzt haben, sondern verschiedene Gemische aus Levan und Glycerin. Glycerin erzeugt im angesprochenen Bereich zwischen  $800 - 1400\text{ cm}^{-1}$  ebenfalls Resonanzsignale, was eine Bestimmung der Levan-Verschiebungen erschwert (Danish et al. 2017). Zusammengefasst lieferten die analytischen Verfahren einen validen Nachweis dafür, dass *G. japonicus* LMG 1417 Levan als EPS produziert. Damit reiht sich der Organismus ein in eine Reihe von Vertretern der Gattung *Gluconobacter*, für die ein analytischer Nachweis der Levan-Produktion erbracht werden konnte (Elisashvili 1980; Jakob et al. 2012; Semjonovs et al. 2016).

#### 4.1.2 Charakterisierung der rekombinanten Levansucrase LevS1417

Nachdem *G. japonicus* LMG 1417 als Levan-Produzent verifiziert wurde, konnten bioinformatische Untersuchungen ein Gen (GenBank-Eintrag: AD937\_13255) im Genom des untersuchten Stammes identifizieren, dessen Genprodukt wahrscheinlich die Synthese des  $\beta$ -2,6-glykosidischen Fruktan-Polymers katalysiert. Laut Annotation kodiert das Gen AD937\_13255 für eine nicht näher spezifizierte Sucrase. In der Vorbereitung auf die Klonierung des Sucrase-kodierenden Gens wurden verschiedene Browser-basierte Tools eingesetzt, um Proteinfunktionen und -eigenschaften aus den vorhandenen

Sequenzdaten abzuleiten. Der Fokus lag dabei besonders auf der Identifizierung potenzieller Signalsequenzen, die für eine heterologe Produktion in *E. coli* hinderlich sein können. Keines der in diesem Zusammenhang verwendeten Tools (SignalP-5.0, TatP 1.0, Phobius, TMHMM 2.0) konnte ein Signalpeptid in der entsprechenden Aminosäure-Sequenz aufklären. Dies erschien zunächst verwunderlich, da sich eine zytoplasmatische oder periplasmatische Lokalisation von Levansucrasen in Anwesenheit von Saccharose letal auf den Organismus auswirkt. Aus diesem Grund wird die Levansucrase SacB aus *B. subtilis* als Selektionsmarker in genetischen Systemen eingesetzt (Blomfield et al. 1991).

#### 4.1.2.1 Phylogenetische Unterteilung von Levansucrasen in Essigsäurebakterien

Sequenz-Analysen konnten aufdecken, dass Levansucrasen von Essigsäurebakterien in zwei phylogenetische Klassen eingeteilt werden können. Demnach sind Enzyme der Gattungen *Acetobacter*, *Kozakia* und *Gluconobacter* (Typ-1-Levansucrasen) phylogenetisch eng verwandt mit der Levansucrase aus *Zymomonas mobilis* ( $\alpha$ -Proteobakterium, Familie Sphingomonadaceae) und Levansucrasen aus  $\gamma$ -Proteobakterien wie *Pseudomonas syringae* und *Erwinia amylovora* (Jakob et al. 2019). Im Gegensatz dazu weisen die Enzyme der Gattungen *Gluconacetobacter* und *Asaia* (Typ-2-Levansucrasen) hohe phylogenetische Übereinstimmung zur Levansucrase aus *Beijerinckia indica* ( $\alpha$ -Proteobakterium, Familie Beijerinckiaceae) und Levansucrasen der Gattungen *Burkholderia*, *Paraburkholderia* ( $\beta$ -Proteobakterien, Familie Burkholderiaceae) und *Azotobacter* ( $\gamma$ -Proteobakterium, Familie Pseudomonadaceae) auf. Der Sekretionsmechanismus von Typ-2-Levansucrasen, wie der Levansucrase LsdA aus *G. diazotrophicus* SRT4 konnte nahezu vollständig aufgeklärt werden. Diese verfügt über ein N-terminales Signalpeptid, bestehend aus 30 Aminosäuren (Hernández et al. 1999), welches mit Hilfe der oben gelisteten Tools unproblematisch identifiziert werden kann. Während der Translokation des Proteins in den periplasmatischen Raum wird das Signalpeptid durch eine spezifische Signal-Peptidase abgetrennt und das N-terminale Glutamin in ein zyklisches Pyroglutamat umgewandelt. Dieses schützt das Polypeptid vor N-terminalem proteolytischem Abbau. In einem zweiten Schritt wird das gefaltete Protein mit Hilfe der Typ-II-Sekretionsmaschinerie durch die äußere Zellmembran transportiert.

Anders als die beschriebenen Typ-II-Levansucrasen verfügen bisher untersuchte Levansucrasen des Typ I, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchte Levansucrase zugeordnet werden kann, über keine bekannten Signalmotive. Es wird daher vermutet, dass diese Proteine ohne jegliche Form der proteolytischen Modifikation in den extrazellulären Raum entlassen werden (Jakob et al. 2019). Die Sekretionsmaschinerie, die die Signalpeptid-unabhängige Translokation der Typ-I-Levansucrasen vermittelt, konnte bis dato weder in Essigsäurebakterien noch in den beschriebenen Gattungen *Pseudomonas* oder *Erwinia* identifiziert werden.

Auf Grundlage der bioinformatischen Analysen wurde für die Klonierung des pASK5-Überexpressionsplasmids daher die gesamte Nukleotidsequenz des Gens (GenBank-Eintrag: AD937\_13255) amplifiziert und in den Vektor eingebracht. Die Klonierung sowie die Transformation

des Plasmids pASK5\_levS1417 konnte durch Kolonie-PCR der generierten Transformanten bestätigt werden (Abbildung 7). Das Protein ließ sich mit einem Ertrag von 11,5 mg pro L *E. coli* Kultur effizient heterolog produzieren. In der Literatur existiert lediglich ein einzige Publikation, in der eine Levansucrase aus der Gattung *Gluconobacter* heterolog in *E. coli* produziert wurde (Jakob et al. 2012). Jakob *et al.* nutzen für die heterologe Produktion in *E. coli* Top10 den Vektor der pBADMyHis-Serie (Thermo Fisher Scientific; Schwerte, Deutschland) und konnten aktives, rekombinantes Protein produzieren. Dieser Nachweis erfolgte makroskopisch auf Basis der beobachteten Schleimproduktion, die von transformierten *E. coli* Zellen ausging. Da keine Aufreinigung der His<sub>6</sub>-getaggtten Proteine erfolgte, kann an dieser Stelle kein Vergleich über die Effizienz der verwendeten Expressionssysteme getätigt werden. In dieser Arbeit wurde somit erstmals eine Levansucrase aus der Gattung *Gluconobacter* nach heterologer Produktion in *E. coli* aufgereinigt und die rekombinante Proteinausbeute quantifiziert.

Die enzymatische Charakterisierung der Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 offenbarte eine typische Anpassung des extrazellulären Proteins an bevorzugte Lebensräume dieser Gattung. *Gluconobacter* gedeiht in zuckerreichen Habitaten wie beispielsweise in oder auf Blüten und Früchten (Blackwood et al. 1969; Ameyama 1975; Passmore & Carr 1975) und konnte zusätzlich von Insekten isoliert werden, die als Überträger von Essigsäurebakterien angesehen werden können (Crotti et al. 2010). Die optimalen Wachstumsbedingungen von *Gluconobacter* sp., die bei Temperaturen zwischen 25 – 30 °C und einem pH von 5,5 – 6 liegen, spiegeln die Bedingungen in den beschriebenen Habitaten wieder (Gupta et al. 2001). Der optimale pH-Wert von 5, der für die Levansucrase LevS1417 nachgewiesen wurde, impliziert eine ideale Anpassung an den bevorzugten Lebensraum. Das wohl bedeutendste Merkmal der rekombinanten Levansucrase sind die kinetischen Parameter, die durch die Erstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik aufgedeckt wurden (Abbildung 10). So zeigte das Enzym unter physiologischen Bedingungen eine außerordentlich hohe spezifische Aktivität von  $2826 \pm 102,5$  U mg<sup>-1</sup>. In Bezug auf die Brenda-Datenbank handelt es sich dabei um die höchste spezifische Aktivität, die für ein Enzym dieser Enzymklasse (EC 2.4.1.10) jemals detektiert wurde (Jeske et al. 2019). Laut der Datenbank wurde die bisher höchste spezifische Aktivität mit  $2603 \pm 34$  U mg<sup>-1</sup> für die Levansucrase LsdA aus *G. diazotrophicus* SRT4 nachgewiesen (Hernández et al. 1999). An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass die LsdA-Aktivitätsbestimmung bei 40 °C erfolgte, was nicht den physiologischen Bedingungen von *G. diazotrophicus* SRT4 entspricht (Gillis et al. 1989). In ihrem aktuellen Review aus dem Jahr 2019 haben die Autoren um Wei Xu die spezifische Aktivität verschiedener Levansucrasen zusammengetragen und aufgelistet (Xu et al. 2019). Von den dort aufgeführten 18 Levansucrasen wird mit 714 U mg<sup>-1</sup> für die Levansucrase aus *Rhanella aquatilis* die höchste spezifische Aktivität angegeben (Ohtsuka et al. 1992). Der Vergleich mit dem Review unterstreicht nochmals die Bedeutung der in dieser Arbeit für LevS1417 nachgewiesenen Aktivität. Zusätzlich zu der hohen Umsatzrate zeigte die rekombinante Levansucrase eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Beide Faktoren, Enzym-Aktivität und -Stabilität, sind essentielle

Faktoren für industrielle Applikationen, da sie maßgeblich die Prozessdauer und -kosten beeinflussen (Eisenthal et al. 2006).

#### **4.1.2.2 Der nicht-prozessive Elongationsmechanismus der Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417**

Unter Verwendung der gereinigten Levansucrase LevS1417 konnte in einem *in-vitro*-Assay das Produktspektrum des rekombinanten Enzyms bestimmt werden (Abbildung 11). Der chromatographische Nachweis der Reaktionsprodukte deckte auf, dass das Enzym neben polymerem Levan größere Mengen eines unbekanntes Tri- und Tetrasaccharids produzierte. Zum Zeitpunkt der Versuchsauswertung wurde vermutet, dass es sich bei diesen Substanzen um 6-Kestose und 6-Nystose, die Vorläufer-Moleküle der Levan-Synthese, handelt. Das verwendete Säulensetup, bestehend aus der Aminex HPX-42A und einer speziellen De-Ashing-Kartusche (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland), ermöglichte aufgrund des dominierenden Größenausschluss-Charakters keine Differenzierung zwischen FOS mit gleichem Polymerisierungsgrad aber variierendem Bindungstypen. Aus diesem Grund konnten die durch die Levansucrase produzierten FOS zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig identifiziert werden. Grundsätzlich konnte der durchgeführte Versuch die hohe Umsatzrate der rekombinanten Levansucrase bestätigen. In neun Stunden erzielte das Enzym bei einer eingesetzten Enzym-Konzentration von 5,56 mg L<sup>-1</sup> Reaktion einen Ertrag von 319,6 ± 17,9 g L<sup>-1</sup>. Diese Berechnung stützt sich auf Verordnung Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlamentes und des Rates, der nach nur Kohlenhydratpolymere als Ballaststoff deklariert werden können, die aus drei oder mehr Monomer-Einheiten bestehen. Demnach können sowohl die im Zuge der Reaktion synthetisierten Tri- und Tetrasaccharide als auch das produzierte polymere Levan als präbiotische Ballaststoffe eingeordnet werden. Des weiteren deckte der durchgeführte Versuch auf, dass die Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 nach dem nicht-prozessiven Elongationsmechanismus fungiert. Untersuchungen zeigten, dass sich der von Levansucrasen katalysierte Prozess der Fruktan-Synthese erheblich unterscheiden kann, je nach Herkunft und Struktur des Proteins (Raga-Carbajal et al. 2016). Im Laufe der Zeit wurde daher postuliert und experimentell bestätigt, dass die Enzyme der Enzymklasse 2.1.4.10 entweder nach einem prozessiven oder nicht-prozessiven Elongationsmechanismus arbeiten (Abbildung 53). Der erstgenannte Mechanismus zeichnet sich dadurch aus, dass die im Zuge der Levan-Synthese entstehende Fruktan-Kette sukzessive durch Fruktose-Einheiten erweitert wird und diese erst vom Enzym dissoziiert, wenn ein bestimmter Polymerisierungsgrad erreicht wurde. Prominente Beispiele für Enzyme, die nach diesem Modell arbeiten, sind die Levansucrasen aus *Bacillus subtilis* (Ortiz-Soto et al. 2008), *Lactobacillus reuteri* 121 (Ozimek et al. 2006b) und *Bacillus megaterium* (Homann et al. 2007). Beim nicht-prozessiven Elongationsmechanismus hingegen können die fruktosylierten Reaktionsprodukte in die Prozesslösung abgegeben und erneut aufgenommen werden, was zur Akkumulation von Fruktooligosacchariden führt (Kralj et al. 2008). Dieser Mechanismus wurden bei den Levansucrasen aus *G. diazotrophicus* (Hernandez et al. 1995) und *Zymomonas mobilis* (Doelle et al. 1993) und der Inulosucrase aus *L. reuteri* 121 (Ozimek et al. 2006b) beobachtet.

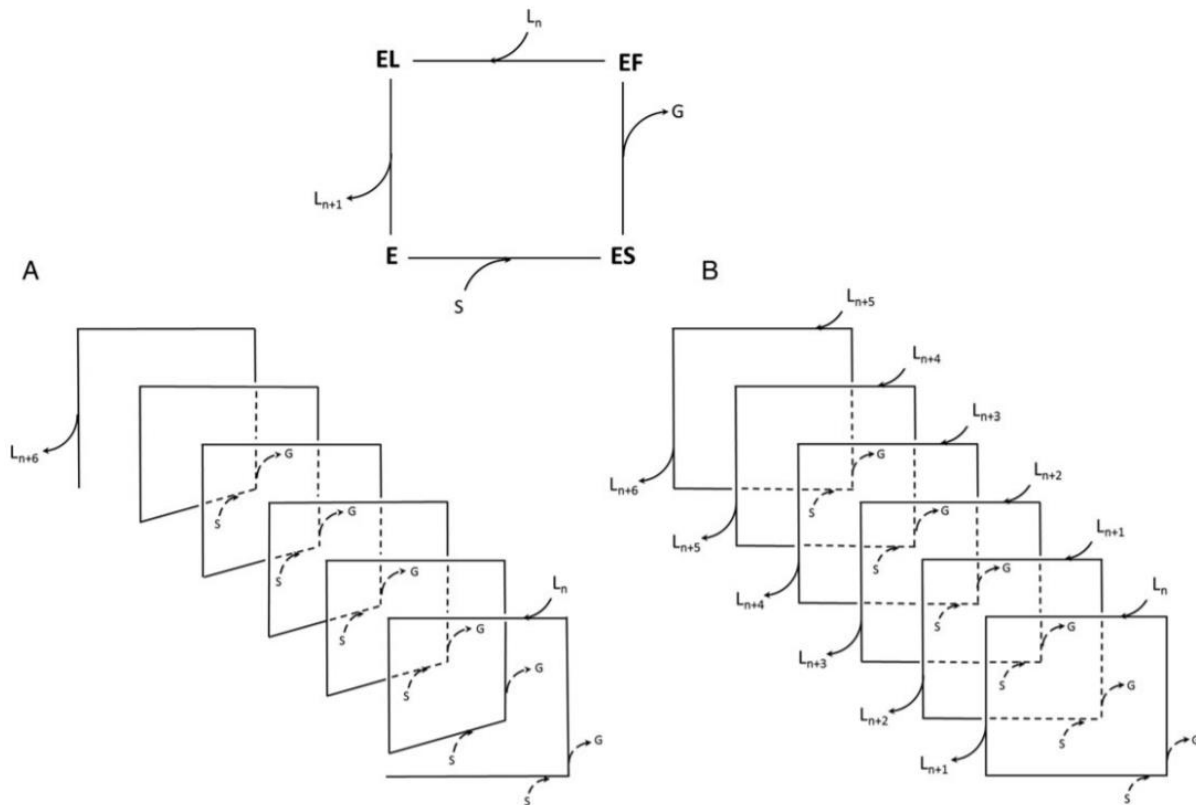


Abbildung 53: Schematisches Modell des prozessiven (A) und nicht-prozessiven (B) Elongationsmechanismus von Levansucrasen. Im oberen Quadrat ist die Ausbildung des temporären Enzym-Fruktosyl-Intermediates (EF) sowie die Übertragung der Fruktosyl-Einheit auf ein Akzeptor-Molekül (L) dargestellt. Der prozessive Elongationsmechanismus zeichnet sich durch eine sukzessive Elongation der Fruktankette aus, bei der das Enzym-Fruktosyl-Intermediat bis zur Ausbildung eines bestimmten Polymerisierungsgrades assoziiert bleibt. Der nicht-prozessive Mechanismus beinhaltet eine kontinuierliche Dissoziation und Neubindung des fruktosylierten Produktes. Entnommen aus Raga-Carbajal et al. 2016.

#### 4.1.2.3 Einflussfaktoren für das Produktspektrum von Levansucrasen

Die Kettenlänge der Reaktionsprodukte wird jedoch nicht nur durch den Strukturbedingungen Elongationsmechanismus beeinflusst. Die Reaktionsbedingungen, unter denen die enzymatische Reaktion abläuft, haben großen Einfluss auf den Polymerisierungsgrad der Fruktan-Ketten. Während Additive wie Ethanol, Polyethylenglykol oder Acetonitril die Synthese von hochmolekularem (HMW) Levan begünstigen, führt eine Erhöhung der Ionen-Stärke zur Akkumulation von niedermolekularem (LMW) Levan (Tanaka et al. 1980; Yamamoto et al. 1985; Chambert & Petit-Glatron 1989). Dieser Effekt zeigte sich auch für die Levansucrase aus *B. licheniformis*, bei der eine hohe Ionen-Stärke die Ausbildung einer einzelnen LMW-Levan-Fraktion lancierte (Nakapong et al. 2013), was beweist, dass das Produktspektrum von Levansucrasen durch Additive moduliert werden kann. Für eine möglichst effiziente Produktion von Levan-basierten Fruktanen scheint sich die Zugabe von Acetonitril zu entsprechenden Prozesslösungen zu eignen. Régis Chambert und Marie-Francoise Petit-Glatron konnten experimentell belegen, dass die Levansucrase aus *B. subtilis* in 50 %-igem Acetonitril nahezu keine nachweisbare hydrolytische Aktivität ausübt (Chambert & Petit-Glatron 1989). In 60 %-igem Acetonitril setzte das Enzym das Substrat Saccharose etwa dreimal schneller um als in wässriger

Lösung, was auf eine Aktivierung des Enzyms durch Acetonitril hindeutet. Neben Acetonitril konnten auch 1,4-Dioxan und Aceton eine Enzym-Aktivierung induzieren, obwohl sich die Substanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaften (dielektrischen Konstante  $\epsilon$  & elektrisches Dipolmoment  $p$ ) stark voneinander unterscheiden. Ein allgemeines Gesetz über den Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die katalytische Aktivität von Levansucrasen kann daher nicht formuliert werden. Beachtet werden muss an dieser Stelle, dass ein Prozess, basierend auf 60 %-igem Acetonitril, geringere Raum-Ausbeuten ermöglicht, da die initiale Saccharose-Konzentration deutlich niedriger gewählt werden muss, um ein Präzipitieren des Disaccharids im Lösungsmittel zu verhindern. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass der Einsatz von Lösungsmitteln die Prozesskosten einer industriellen Produktion erhöhen könnten. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass sich hohe Zuckerkonzentrationen positiv auf die Rückgewinnung von Acetonitril aus Acetonitril-Wasser-Gemisches auswirken (Wang et al. 2008).

Neben den zuvor erwähnten Additiven können weitere Faktoren das Produktspektrum von Levansucrasen modulieren. Die mexikanischen Forscher um Jaime R. Porras-Domínguez konnten mehrere Faktoren ermitteln, die die katalytische Aktivität der Levansucrase aus *B. subtilis* 168 beeinflussen (Porras-Domínguez et al. 2015). Sie zeigten anhand der aufgereinigtem Levansucrase SacB, dass durch niedrige Temperaturen eine höhere Transfruktosylierungseffizienz erzielt werden kann. Eine ähnliche Zunahme der Transfruktosylierungseffizienz wurde auch durch eine Erhöhung der Substrat-Konzentration beobachtet. Die Reduktion der Inkubationstemperatur führte zusätzlich zu einem Anstieg des Polymerisierungsgrades der enzymatisch produzierten Fruktanketten. Ausgehend von einer Saccharose-Konzentration von 200 mM wurde bei 4 °C eine Levan-Fraktion mit einem mittleren Molekulargewicht von 20,64 kDa produziert. Durch einen Anstieg der Reaktionstemperatur auf 37 °C verringerte sich das mittlere Molekulargewicht des produzierten Levans auf 7,73 kDa. Unter Verwendung höherer Saccharose-Konzentrationen (600 mM) minimierte sich dieser Effekt, da die generierten Levane vergleichbare Molekulargewichte von 4,5 (4 °C) und 4,98 (30 °C) kDa aufwiesen. In diesem Zusammenhang kann spekuliert werden, dass sich der mit Hilfe der Levansucrase LevS1417 durchgeführte *in-vitro*-Assay (Abbildung 11) in einem Konzentrationsbereich befand, der eine optimale Transfruktosylierung begünstigte. Porras-Dominguez und Kollegen untersuchten in ihrer Studie zusätzlich den Einfluss variierender Enzym-Konzentrationen auf das von SacB gebildete Produktspektrum (Porras-Domínguez et al. 2015). Sie konnten beweisen, dass geringe Enzymkonzentrationen (0,1 U ml<sup>-1</sup>) die Synthese von hochmolekularem Levan fördern, während hohe Enzymkonzentrationen (5 U ml<sup>-1</sup>) zur Akkumulation von niedermolekularem Levan führen. Bei einer Enzymkonzentration von 1 U ml<sup>-1</sup> wurde eine bimodale Verteilung der Reaktionsprodukte, also eine simultane Akkumulation von HMW-Levan und LMW-Levan, detektiert. Für die *in-vitro*-Reaktion, die in dieser Arbeit analysiert wurde, wurden 16 U ml<sup>-1</sup> der rekombinanten Levansucrase LevS1417 eingesetzt, was die Akkumulation der Tri- und Tetrasaccharide erklären könnte. Höhere Enzym-Konzentrationen könnten somit nicht nur die Raum-Zeit-Ausbeute der Reaktion steigern, sondern auch zu einer direkten Synthese präbiotischer FOS führen. Angemerkt werden muss an dieser Stelle, dass es

sich bei den FOS, die von Levansucrasen synthetisiert werden, um FOS der Formel  $GF_n$  handelt, wobei  $n$  den Grad der polymerisierten  $\beta$ -D-Fruktosyl-Einheiten angibt.

### 4.1.3 *In-vivo*-Produktion Levan-basierter Fruktane durch *G. japonicus* LMG 1417

Die Erkenntnisse der enzymatischen Charakterisierung von LevS1417 wurden genutzt, um die *in-vivo*-Produktion Levan-basierter FOS durch *G. japonicus* LMG 1417 zu optimieren. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität der rekombinanten Levansucrase und der verfügbaren genetischen Tools für die Gattung *Gluconobacter* (Kallnik et al. 2010), wurde ein Überexpressionsstamm auf Basis von *G. japonicus* LMG 1417 erstellt, der Plasmid-vermittelt zur homologen Expression von LevS1417 befähigt ist. Wie die photometrische Aktivitätsbestimmung der Levansucrase-Aktivität in verschiedenen Fraktionen zeigte, konnte der Überexpressionsstamm *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 erhöhte Levansucrase-Mengen in den Kulturüberstand sekretieren (Kapitel 3.3.1). Dadurch wurde bestätigt, dass der Organismus in der Lage ist, den konstitutiven p264 Promotor zu erkennen. Bei diesem Promotor handelt es sich um die 5'-UTR des Gens *gox0265* aus *G. oxydans* 621H, der nachweislich eine starke Expression stromabwärts gelegener Gene ermöglicht (Kiefler et al. 2017; Battling et al. 2020; Hoffmann et al. 2020). Die Menge an sekretierter Levansucrase konnte durch die Plasmid-basierte Produktionsstrategie um den Faktor 2,5 gesteigert werden. Die Quantifizierung der G6PDH-Aktivität in den präparierten Fraktionen konnte beweisen, dass zum Zeitpunkt der Aktivitätsbestimmung keine relevanten Mengen an Zellen lysiert waren.

#### 4.1.3.1 Batch-Kultivierung von *G. japonicus* LMG 1417

Die Ergebnisse der photometrischen Aktivitätsbestimmung konnten durch weitere Versuche untermauert werden. In Kultur-basierten Ansätzen setzte die Überexpressionsmutante supplementierte Saccharose (450 mM) deutlich schneller um als der Wildtyp-Stamm *G. japonicus* LMG 1417 (Abbildung 15). Die auf Saccharose bezogenen Umsatzraten von  $2,88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Wildtyp) bzw.  $6,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Überexpressionsstamm) bzw. das Verhältnis dieser Umsatzraten spiegelten dabei die im Zuge der photometrischen Aktivitätsbestimmung nachgewiesenen relativen Levansucrase-Aktivitäten wieder. Durch eine Steigerung der initialen Saccharose-Konzentration wurde die Osmotoleranz des generierten Stammes ausgetestet. Es zeigte sich, dass *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 Substratkonzentrationen von bis zu 1,2 M tolerierte, das verwendete MES-Puffersystem jedoch nicht ausreichte, um die im Zuge des oxidativen Stoffwechsels von *Gluconobacter* gebildeten Zuckersäuren abzufangen. Die Gattung *Gluconobacter* ist bekannt für ihre Fähigkeit zur unvollständigen Oxidation verschiedener Monosaccharide (Gupta et al., 2001). Vertreter dieser Gattung verfügen über ein umfangreiches Set von membrangebundenen Oxidoreduktasen, die mit der Atmungskette des gram-negativen  $\alpha$ -Proteobakteriums verknüpft sind und im Periplasma die Oxidation von Zuckern katalysieren. Eine dieser Oxidoreduktasen, die D-Glukose-Dehydrogenase, oxidiert D-Glukose periplasmatisch zu D-Glukonat. Durch eine tblastn-Analyse konnte in den verfügbaren „Whole Genome Shotgun“-Kontigs von *G. japonicus* LMG 1417 ein Homolog der D-Glukose-Dehydrogenase *Gox0265*

aus *G. oxydans* 621H identifiziert werden (GenBank-Eintrag: KXV26275.1). Es ist anzunehmen, dass dieses Protein die im Zuge der Levansucrase-vermittelten Saccharose-Spaltung freiwerdenden Glukose-Einheiten zu Glukonat oxidiert. Glukonat und die Oxidationsprodukte 2- und 5-Keto-Glukonat werden durch *Gluconobacter* produziert (Richhardt et al. 2013) und stellen im vorgestellten Produktionsprozess für Levan wünschenswerte Nebenprodukte dar. Glukonsäuren haben einen hohen industriellen Wert, da sie in der Lebensmittelindustrie als Komplexbildner, Säureregulatoren und Stabilisatoren eingesetzt werden (Gupta et al. 2001). Die hohe Osmotoleranz des hier untersuchten Stammes ermöglicht, dass ausgehend von sehr hohen Saccharose-Konzentrationen neben Levan und Levan-FOS größere Mengen der beschriebenen Glukonsäuren akkumulieren, was in einer starken Abnahme des pH-Wertes resultiert. Wie der Verlauf des pH-Spektrums in den Kultivierungen der konstruierten Überexpressionsmutante zeigte, reichten weder 100 mM (Abbildung 16) noch 200 mM (Abbildung 17) des verwendeten MES-Puffers aus, um dem Absinken des pH-Wertes adäquat entgegenzuwirken. Zusätzlich zeigte sich unter Verwendung von 200 mM MES-Puffer kein Wachstum in Kulturen, denen Saccharose in einer Konzentration von 1,2 M zugesetzt wurde. Aus industrieller Sicht kann eine so hohe Konzentration von organischen Säuren jedoch nur durch automatisierte pH-Titration abgefangen werden und nicht durch ein Puffer-System, wie sich im Zuge der Batch-Kultivierungen von *G. japonicus* LMG 1417 zeigte.

Eine Levan-Quantifizierung erfolgte während der Batch-Kultivierungen nicht, da im Kultivierungsverlauf zwar zunächst eine starke Zunahme der Medienviskosität beobachtet wurde, diese jedoch im späten Verlauf der Inkubation rapide abnahm. Dies deutete darauf hin, dass *G. japonicus* LMG 1417 in der spät-exponentiellen oder stationären Wachstumsphase ein oder mehrere Levan-hydrolysierende Enzyme sekretiert. Um auszuschließen, dass chemische Hydrolyse die beobachtete Viskositätsabnahme verursachte, wurde kommerzielles Levan den Bedingungen während der stationären Wachstumsphase ausgesetzt. Chromatographisch konnte keine Freisetzung von Fruktose oder Oligosacchariden nachgewiesen werden, was eine chemische Hydrolyse des produzierten Levans ausschloss.

#### **4.1.3.2 Funktionelle Validierung der potenziellen Levanasen aus *G. japonicus* LMG 1417**

Aufgrund der beobachteten Viskositätsabnahme in der späten Wachstumsphase von *G. japonicus* LMG 1417 erfolgten bioinformatische Recherchen, um auf Basis der vorhandenen Sequenzdaten des untersuchten Essigsäurebakteriums die mögliche Levan-Hydrolyse zu erklären. Tblastn-Analysen deckten dabei ein Gen im Genom von *G. japonicus* LMG 1417 auf, das laut Annotation für eine Levanasen und somit für ein Levan-hydrolysierendes Enzym kodiert. Um einordnen zu können, ob das Genprodukt (GenBank-Eintrag: KXV26505.1) der Auslöser für die Viskositätsabnahme war, wurde die kodierende Nukleotidsequenz in einen pASK-IBA5 Überexpressionsvektor eingebracht. In Vorbereitung auf die Klonierung wurde bioinformatisch aufgeklärt, dass das translatierte Polypeptid über ein N-terminales Signalpeptid verfügt. Gemäß des TatP 1.0 Prediction Tools handelte es sich dabei um ein Signalpeptid des Twin-Arginin-Translokationsapparates (Abbildung 54).



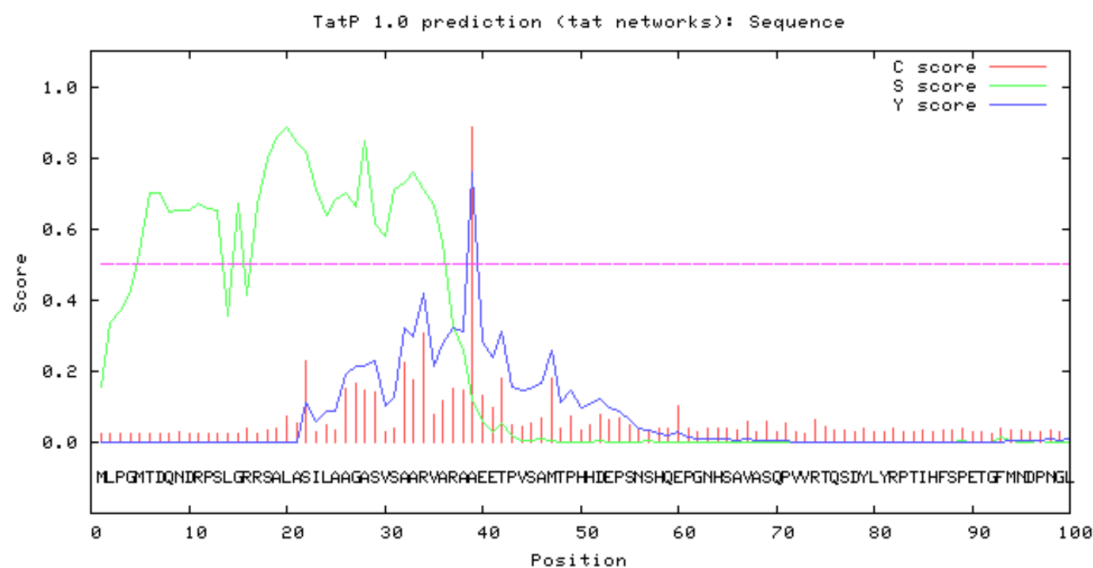


Abbildung 54: Graphische Darstellung des bioinformatisch identifizierten N-terminalen Signalpeptids der potenziellen Levanase KXV26505.1 aus *G. japonicus* LMG 1417. Die Analyse der gesamten Aminosäuresequenz erfolgte durch das Browser-basierte Tool TatP 1.0. Bei dem C-Score handelt es sich um einen „Cleavage“-Wert, der ein signifikantes Maximum am Ort der Signalpeptid-Spaltung aufweisen sollte. Der S-Score wird für jede einzelne Aminosäure kalkuliert und gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Aminosäure Bestandteil eines Signalpeptids ist. Der Y-Score ist eine Ableitung des C-Scores unter Einbezug des S-Cores, was zu einer besseren Vorhersage der Spaltungsstelle führt als der rohe C-Score allein.

Der TAT-Apparat zeichnet sich durch den Transport von Proteinen im gefalteten Zustand aus und ist in nahezu allen  $\alpha$ -Proteobakterien funktionell vorhanden (Nuñez et al. 2012). In *G. oxydans* 621H, dessen Genom vollständig sequenziert vorliegt (Prust et al. 2005), lassen sich alle drei Untereinheiten des TAT-Apparates bioinformatisch zuweisen.

Tabelle 29: Tblastn-Analyse der Komponenten des TAT-Apparates. Die Aminosäure-Sequenzen der TAT-System-Komponenten aus *G. oxydans* 621H wurden gegen die Whole-Genome-Shotgun-Kontigs von *G. japonicus* LMG 1417 geblastet.

Komponente des TAT-Systems	Homolog in <i>G. oxydans</i> 621H	Homolog in <i>G. japonicus</i> LMG 1417	Identität [%]
TatA	Gox1241	KXV27614.1	84
TatB	Gox1757	KXV26022.1	70
TatC	Gox1758	KXV26021.1	87

Durch tblastn-Analysen konnten die entsprechenden Gene des Apparates auch im Genom von *G. japonicus* LMG 1417 nachgewiesen werden (Tabelle 30). In der Regel werden Proteine durch den Sec-unabhängigen TAT-Transport lediglich über eine Plasmamembran transloziert (Sargent et al. 2006). Dieser Umstand stand im Widerspruch mit der potenziellen Levan-abbauenden Funktion von KXV26505.1, da diese Funktion nur im extrazellulären Raum ausgeübt werden kann. Um die Funktion des Enzyms einordnen zu können, wurden die Aminosäuren 39-648 der kodierenden Nukleotidsequenz in den pASK-IBA5 Vektor inseriert und dieser in *E. coli* NEB5-alpha transformiert. Anschließend

erfolgte die heterologe Produktion der potenziellen Levanase, die im Anschluss mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde. Bei enzymatischen Assays zeigte das rekombinante Enzym weder für Levan noch für Inulin hydrolytische Aktivität. Unter Verwendung des Substrates Saccharose konnte jedoch sowohl durch eine photometrische Aktivitätsbestimmung als auch durch chromatographische Nachweismethoden eine hydrolytische Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.3.2 Charakterisierung der potenziellen Levanase aus *G. japonicus* LMG 1417). Die HPLC-Analysen offenbarten, dass das Enzym Saccharose mit einer spezifischen Aktivität von 29,3 U mg<sup>-1</sup> in die monomeren Untereinheiten Glukose und Fruktose spaltet. Inzwischen konnte aufgeklärt werden, dass es sich bei der potenziellen Levanase um eine  $\beta$ -Fruktofuranosidase/Invertase der Enzymklasse 3.2.1.26 handelt (Hoffmann et al. 2020). Enzyme dieser Proteinfamilie zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, terminale nicht-reduzierende  $\beta$ -D-Fruktofuranosid-Einheiten aus entsprechenden Di- oder Oligosacchariden abzuspalten. Zusammen mit den  $\alpha$ -Glukosidasen (EC 3.2.1.10) und Oligo-1,6-Glucosidasen (EC 3.2.1.48), bilden  $\beta$ -Fruktofuranosidasen die Überfamilie der Sucrasen. Die in dieser Arbeit identifizierte Invertase konnte sich aufgrund der hohen spezifischen Aktivität für die effiziente Produktion des neuartigen Süßstoffes 5-Ketofruktose etablieren. Im entsprechenden Produktionsprozess katalysiert die Invertase die Hydrolyse des nachwachsenden und günstigen Ausgangssubstrates Saccharose in die monomeren Einheiten Glukose und Fruktose (Hoffmann et al. 2020). Der freigesetzte Fruktose-Anteil wird dann durch Vertreter der Gattung *Gluconobacter* zu 5-Ketofruktose oxidiert. Die Oxidation der Ketohehexose wird dabei durch den Membrangebundenen Fruktose-Dehydrogenase Komplex FDH<sub>scf</sub> katalysiert. Ausgehend von Fruktose konnte durch die Plasmid-vermittelte Produktion der Fruktose-Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H eine 5-Ketofruktose-Ausbeute von 489 g L<sup>-1</sup> generiert werden, was einer relativen Ausbeute von 98 % entsprach (Herweg et al. 2018). Die Verbindung zeigt im Vergleich zu D-Fruktose (10.2 mmol L<sup>-1</sup>) einen geringfügig höheren Schwellenwert (16,4 mmol L<sup>-1</sup>) in Bezug auf die Süßkraft. Ein Panel aus geschulten Sensorik-Experten konnte iso-süße Lösungen von 5-Ketofruktose und Fruktose hinsichtlich Süßkraft und Süßqualität nicht voneinander unterscheiden (Herweg et al. 2018). Aufgrund der vielversprechenden sensorischen Eigenschaften und der ertragreichen Produktionsverfahren werden zurzeit intensive Bemühungen angestellt, um die Verträglichkeit von 5-Ketofruktose für den Menschen zu untersuchen.

Tblastn-Analysen konnten keine weiteren Gene im Genom von *G. japonicus* LMG 1417 identifizieren, die für Levan-hydrolysierende Enzyme kodierte. Da die Anzahl an charakterisierten Levan-abbauenden Enzymen mit vorhandenen Sequenzdaten überschaubar ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Organismus dennoch über eine entsprechende Hydrolase verfügt, die die Viskositätsabnahme im späten Verlauf der Batch-Kultivierungen verursachte.

#### 4.1.3.3 Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417

Um die pH-Problematik der Batch-Kultivierungen zu umgehen (Kapitel 3.3.2 *G. japonicus* LMG 1417 vs. *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417: Batch-Kultivierung), erfolgte eine Fermentation

von *G. japonicus* LMG 1417 und dem generierten Überexpressionsstamm *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 mit automatisierter pH-Regulation (Kapitel 3.3.4 Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 und dem erstellten Überexpressionsstamm). Durch diese sollten höhere Zelldichten und somit eine schnellere Umsetzung hochkonzentrierter Saccharose-Lösungen erzielt werden. Wie der entsprechende Wachstumsverlauf der Fermentationen zeigt (Abbildung 22), konnte lediglich der Überexpressionsstamm in dem hoch-osmotischen Medium wachsen. Für den Wildtyp-Stamm wurde zwar innerhalb der ersten 20 Stunden der Fermentation eine Zunahme der OD<sub>600nm</sub> beobachtet, das Wachstum stagnierte ab da an jedoch, sodass die OD<sub>600nm</sub> einen finalen Wert von 0,41 nicht überschritt. Im Gegensatz dazu zeigte der Überexpressionsstamm ein stärkeres Wachstum und eine damit verbundene stärkere Ansäuerung der Fermentationsbrühe. Nach 40 Stunden Fermentation erreichte der Stamm eine OD<sub>600nm</sub> von  $0,63 \pm 0,04$ . Gleichzeitig wurde durch das Absenken des pH-Wertes auf unter 5,1 die automatische pH-Regelung aktiviert, die den pH-Wert für den Rest der Kultivierung durch NaOH-Zugabe auf einem konstanten Niveau hielt. Nach 90-stündiger Inkubation wurde das Experiment bei einer OD<sub>600nm</sub> von  $0,78 \pm 0,03$  abgebrochen, da eine Stagnation der Saccharose-Umsetzung beobachtet wurde. Im Laufe des Experimentes konnte eine extreme Viskositätszunahme der Fermentationsbrühe beobachtet werden, die die Probennahme und Probenaufbereitung zunehmend erschwerte. Diese Beobachtung veranschaulichte die Problematik der Kultur-basierten Levan-Produktion. Ein Abtrennen der Zellen vom Reaktionsprodukt ist nur unter erheblichem Mehraufwand oder durch den Einsatz spezifischer Levan-hydrolysierender Enzyme möglich, die das Polymer in kürzere Fruktan-Ketten hydrolysieren und somit die Viskosität verringern. Zum Zeitpunkt der letzten Probennahme wurde mittels saurer Hydrolyse des ausgefällten Polymers eine Levan-Ausbeute von  $109 \text{ g L}^{-1}$  ermittelt. In Bezug auf den Übersichtsartikel von Öner *et al.* über Levan aus dem Jahr 2016, handelte es sich dabei um die dritthöchste Ausbeute, die jemals für eine Levan-Produktionsprozess beschrieben wurde. Ein Kultur-basierter Ansatz auf Basis von *B. subtilis* (natto) CCT7712 erzielte in deutlich kürzerer Zeit (16 h) eine Ausbeute von  $111,6 \text{ g L}^{-1}$  (Dos Santos *et al.* 2013). Die höchste bis dato beschriebene Levan-Ausbeute ( $112,53 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde innerhalb von 18 Stunden durch immobilisierte Zellen von *Z. mobilis* CCT 4494 erzeugt (Lorenzetti *et al.* 2015). Es kann davon ausgegangen werden, dass durch eine Optimierung der Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 die Levan-Ausbeute noch weiter gesteigert werden kann. Durch eine Verringerung der initialen Saccharose-Konzentration und des damit verbundenen osmotischen Drucks, könnte ein schnellerer Übergang in die exponentielle Wachstumsphase und möglicherweise eine höhere End-OD<sub>600nm</sub> erreicht werden, was eine vollständige Umsetzung der Saccharose zur Folge haben könnte. In der durchgeführten Versuchsreihe wurde die supplementierte Saccharose nicht vollständig umgesetzt, da zum Zeitpunkt der letzten Probennahme eine Saccharose-Konzentration von etwa 440 mM in der Fermentationslösung nachgewiesen wurde. Zusätzlich zur Medienzusammensetzung sollte auch die Belüftung der Fermentation optimiert werden. Die verwendete Rührereinheit und der im Fermenter befindlichem Rührfisch reichten nicht aus, um eine gleichmäßige Sauerstoffversorgung der Fermentationslösung zu

gewährleisten. Dies äußerte sich mit zunehmender Viskosität dadurch, dass sich in bestimmten Bereichen des Fermenters Luftblasen ansammelten, die weder durch ihren eigenen Auftrieb noch durch die Durchmischung des Rührfisches zur Oberfläche stiegen. Es ist daher anzunehmen, dass sich in Teilen des Fermenters Sauerstoff-limitierte Zonen ausbildeten. Mehrere Studien konnten zeigen, dass sich Sauerstoff-limitierende Bedingungen negativ auf die Produktausbeute und die Gen-Expression von *Gluconobacter* auswirken (Flickinger & Perlman 1977; Hanke et al. 2012).

Trotz nicht-optimierter Bedingungen zeigte die Fermentation des konstruierten Überexpressionsstammes relativ hohe Produktraten. Bezogen auf das Substrat Saccharose ermöglichte die Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Zum Vergleich: Die Raum-Zeit-Ausbeute der Batch-Kultivierung des gleichen Stammes lag bei  $6,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 16). Ein direkter Vergleich zwischen beiden Experimenten kann nicht vorgenommen werden, da für die Fermentation deutlich höhere Saccharose-Konzentrationen eingesetzt wurden als für die Batch-Kultivierung. Aufgrund des vergleichsweise hohen  $K_M$ -Wertes der Levansucrase LevS1417 kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym während der Fermentation über einen längeren Zeitraum nahe ihres  $V_{\max}$  arbeitete, was die höhere Raum-Zeit-Ausbeute erklären könnte.

Angemerkt werden muss an dieser Stelle, dass der konstruierte Überexpressionsstamm im direkten Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm zwar deutlich höhere Umsatzraten ermöglicht, ein solcher Produktionsstamm aus industrieller Sicht jedoch einige Nachteile mit sich bringt. So ist die Verwendung von genetisch modifizierten Organismen (GMOs) in der Lebensmittelindustrie und im agrarwirtschaftlichen Sektor ein in der Öffentlichkeit kontrovers diskutiertes Thema (Friedrich et al. 2019). Dieser Umstand sowie der hohe Zulassungsaufwand für GMO-basierte Prozesse bewegt viele Unternehmen dazu, Biotransformationen mit Wildtyp-Stämmen durchzuführen. Ein zusätzlicher Nachteil einer Plasmid-basierten Produktion ist die Supplementierung von Antibiotika zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks sowie die Zugabe von Induktor-Substanzen. Beide Stoffklassen erhöhen die Kosten entsprechender Fermentationen und müssen im Zuge des Downstream-Prozesses aus der Reaktionslösung entfernt werden.

#### **4.1.4 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417**

Der chromatographisch verfolgte Verlauf der Saccharose-Konzentration während der Fermentation der *G. japonicus* LMG 1417 Stämme offenbarte, dass erhebliche Mengen der supplementierten Saccharose in der stationären Wachstumsphase umgesetzt wurden (Abbildung 23). Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass relevante Mengen der Levansucrase durch den Organismus produziert und in den Kulturüberstand abgegeben wurden und unabhängig von der Vitalität der Zellen Levan produzierten. Wie im Zuge der Enzymcharakterisierung der rekombinanten Levansucrase gezeigt wurde (Abbildung 9), wies das Enzym unter physiologischen Bedingungen eine hohe Stabilität auf. Die Erkenntnisse aus der Fermentationsreihe und der Charakterisierung von LevS1417 deuteten darauf hin, dass der

Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417 zur Zell-freien Produktion von Levan eingesetzt werden könnte. Experimentelle Versuche konnten diese Theorie bestätigen. So zeigte sich, dass sowohl der Überexpressionsstamm als auch der Wildtyp ausreichende Mengen der Levansucrase sekretierte, um hoch-konzentrierte Saccharose-Lösungen nahezu vollständig umzusetzen (Abbildung 24 + Abbildung 25). Die finale Reaktionslösung setzte sich zusammen aus jeweils 2 ml Kulturüberstand von einem der beiden Stämme und 7,8 ml einer 2,3 M Saccharose-Lösung. Durch Zugabe von 200 µl eines 1 M Acetat-Puffers wurden die Ansätze auf pH 5 eingestellt. Wie die Zusammensetzung der Lösung veranschaulicht, machte der Kulturüberstand lediglich 20 % des Reaktionsvolumens aus. Ausgehend von einem Liter bakterieller Kultur können demnach fünf Liter Prozesslösung angesetzt werden. Durch die 1:5 Verdünnung des Kulturüberstandes zeigten die Zell-freien Levan-Produktionen verhältnismäßig niedrige Raum-Zeit-Ausbeuten von 1,97 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Überexpressionsstamm) bzw. 1,12 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Wildtyp), bezogen auf die Umsetzung des Substrates Saccharose. Berücksichtigt man den erwähnten Verdünnungsfaktor liegt die theoretische Raum-Zeit-Ausbeute, die ausgehend von einem Liter *Gluconobacter* Kultur erzielt werden kann, bei 9,85 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Überexpressionsstamm) bzw. 5,6 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Wildtyp). Der Wert des Überexpressionsstammes lag dabei auf einem vergleichbaren Niveau wie während der Fermentation (13 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Mit finalen Ausbeuten von 157,9 ± 7,6 g L<sup>-1</sup> (Wildtyp) und 148,5 ± 12,9 g L<sup>-1</sup> (Überexpressionsstamm) generierten die Zell-freien-Verfahren die höchsten Levan-Ausbeuten, die bis dato in der Literatur beschrieben wurden (Öner et al. 2016). Gegenüber der enzymatischen Levanproduktion (Abbildung 11) konnte das Zell-freie Produktionsverfahren deutlich höhere Levan-Ausbeuten generieren (157,9 ± 7,6 g L<sup>-1</sup> vs. 80,5 ± 1,3 g L<sup>-1</sup>). Dieser Umstand lässt sich durch die deutlich längere Zeit begründen, die unter Verwendung von Kulturüberstand für die Umsetzung der supplementierten Saccharose benötigt wurde. Wie zuvor erwähnt, begünstigen niedrige Levansucrase-Konzentrationen die Produktion von polymerem Levan, während hohe Levansucrase-Konzentrationen zur Akkumulation von niedermolekularem Levan und FOS führen (Porrás-Domínguez et al. 2015; Raga-Carbajal et al. 2016). Diese Beobachtung gibt Grund zur Annahme, dass durch die Variation der Enzym-Konzentration das Produktspektrum der Levansucrase LevS1417 aktiv moduliert werden kann. Neben den hohen Erträgen, die durch das Zell-freie Verfahren generiert wurden, ermöglicht der Einsatz von Kulturüberstand ein einfacheres Downstream-Prozess, da das Abtrennen von Zellen aus der hochviskosen Prozesslösung umgangen wird.

Die chromatographische Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte für die Zell-freie Levan-Produktion erstmals unter Verwendung einer Aminophasen-Trennsäule. Der HILIC-Trennmodus der Säule deckte auf, dass die Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 ausgehend von Saccharose FOS mit gleichem Polymerisierungsgrad aber variierenden Bindungstypen produzierte. So wurden im Reaktionsverlauf relevante Mengen der Trisaccharide 1-Kestose und 6-Kestose sowie weitere Tetrasaccharide mit variierendem Elutionsverhalten detektiert (Abbildung 25). Das Auftreten eines heterogenen FOS-Spektrums ist in der Literatur für mehrere Levansucasen beschrieben, die nach dem nicht-prozessiven Elongationsmechanismus arbeiten (Raga-Carbajal et al. 2016; Raga-Carbajal et al. 2018). Wie

Abbildung 55 veranschaulicht, entstehen im Zuge der Transfruktosylierungsreaktionen, die von Levansucrasen katalysiert werden, die initialen Produkte 1-Kestose, 6-Kestose und Neo-Kestose, was darauf hindeutet, dass Levansucrasen im Bezug auf die primäre Transfruktosylierung eine geringe Regioselektivität besitzen (Raga-Carbajal et al. 2018).

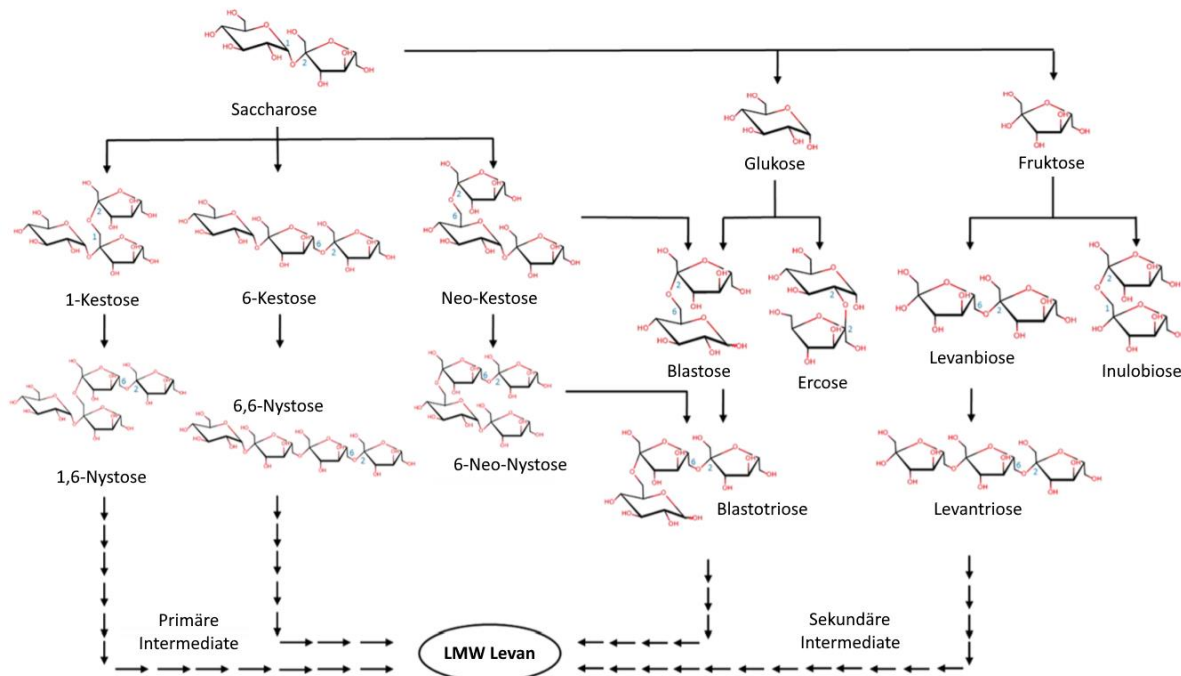


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Zwischenprodukte/Produkte, die im Zuge des nicht-prozessiven Elongationsmechanismus durch die Levansucrase SacB aus *B. subtilis* 168 produziert werden. Entnommen aus Raga-Carbajal et al. 2018; modifiziert.

Aufgrund der sterischen Affinität zu 1-Kestose und 6-Kestose, werden ausgehend von diesen Trisacchariden FOS mit steigendem Polymerisierungsgrad gebildet. Die Verknüpfung neuer Fruktosyl-Einheiten geschieht dabei an Position 6 des Fruktose-Anteils des Akzeptor-Moleküls. Neben dieser Primärreaktion synthetisieren Levansucrasen, die nach dem nicht-prozessiven Elongationsmechanismus fungieren, gering-konzentrierte Sekundär-Intermediate. Diese Intermediate bauen auf den Monosacchariden Glukose und Fruktose auf, die durch die enzymatische Saccharose-Hydrolyse akkumulieren. Abgesehen von den Produkten, die ausgehend von Fruktose synthetisiert werden, weisen alle Produkte der Levansucrase eine terminale Glukose-Einheit auf. Neuste Untersuchungen legten offen, dass FOS mit terminaler Glukose ( $GF_n$ -FOS) das Wachstum von probiotischen Bifidobakterien und Laktobazillen besser fördern als ein Gemisch aus  $GF_n$ -FOS und  $F_n$ -FOS. Die Forscher um Shuai Wang verglichen dafür den präbiotischen Effekt von Inulin-FOS, die durch Fruktosyltransferasen gebildet wurden ( $GF_n$ -FOS) und jenen, die ausgehend von polymerem Inulin durch Endoinulinasen erzeugt wurden ( $GF_n$ -FOS und  $F_n$ -FOS). Wie Tabelle 30 veranschaulicht, zeigten vier der fünf kultivierten Probiotika auf  $GF_n$ -FOS besseres Wachstum als auf dem heterogenen FOS-Gemisch (Wang et al. 2020). Unter Verwendung von Glukose erreichten die untersuchten probiotischen Bifidobakterien *B. lactis* BB12, *B. lactis* FN019 und *B. lactis* B420 die höchsten  $OD_{595nm}$ -Werte. Da Glukose nicht das

Kriterium der selektiven Fermentation erfüllt und durch ein breites Spektrum von Darmbakterien verstoffwechselt wird, kann das Monosaccharid jedoch nicht als Präbiotikum angesehen werden.

Tabelle 30: Wachstum probiotischer Bifidobakterien und Laktobazillen auf Glukose und Inulin-FOS. Die  $OD_{595nm}$ -Werte wurden visuell aus den Abbildungen der Publikation von Wang *et al.* aus dem Jahr 2020 entnommen (Wang *et al.* 2020).

Stamm	Finale $OD_{595nm}$		
	Glukose	GF <sub>n</sub> -FOS	GF <sub>n</sub> -FOS + F <sub>n</sub> -FOS
<i>B. lactis</i> BB-12	1,3	1,1	0,8
<i>B. lactis</i> FN019	1,3	1,05	0,75
<i>B. lactis</i> B420	1,25	1,2	0,8
<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,7	0,75	0,85
<i>L. acidophilus</i> LA-5	0,6	0,5	0,45

Die Forscher untersuchten zusätzlich den Einfluss des Polymerisierungsgrades auf den präbiotischen Effekt. Dafür fraktionierten sie die einzelnen DPs des GF<sub>n</sub>-FOS-Gemischs und verfütterten diese separat an ausgewählte Probiotika. Der Stamm *B. lactis* BB-12 wurde abhängig vom DP unterschiedlich stark in seinem Wachstum gefördert, und zwar in folgender, absteigender Reihenfolge: Glukose > GF<sub>2</sub> > GF<sub>n</sub>-FOS > Fruktose ~ Saccharose ~ GF<sub>3</sub> > GF<sub>4</sub>. Demnach zeigte sich, dass das Trisaccharid 1-Kestose den höchsten präbiotischen Effekt vermittelte und der Organismus an die Verstoffwechslung kurzkettiger Substrate adaptiert ist. Für den probiotischen Stamm *L. acidophilus* NCFM zeigte sich folgende Reihenfolge in Hinsicht auf den wachstumsfördernden Effekt: GF<sub>2</sub> ~ GF<sub>3</sub> > GF<sub>n</sub>-FOS ~ Saccharose ~ GF<sub>4</sub> > Glukose > Fruktose. Grundsätzlich konnten die Forscher experimentell belegen, dass Bifidobakterien eine hohe Selektivität hinsichtlich der strukturellen Zusammensetzung und dem DP von FOS aufweisen. Vertreter der Gattung *Lactobacillus* hingegen scheinen ein breites Spektrum an FOS verstoffwechseln zu können, unabhängig von Struktur und DP. Zusätzlich zeigte sich bei Ihnen eine Präferenz für Oligosacchariden über Monosacchariden (Wang *et al.* 2020).

Durch das Verfahren der in dieser Arbeit etablierten Zell-freien Levan-Produktion wurden demnach neben polymerem Levan größere Mengen präbiotisch wirksamer GF<sub>n</sub>-FOS produziert. Ob GF<sub>n</sub>-FOS mit  $\beta$ -2,6-glykosidischem Bindungscharakter einen ähnlich starken präbiotischen Effekt vermitteln wie die von Wang *et al.* untersuchten Inulin-FOS, kann an dieser Stelle nicht prognostiziert werden. Die Datenlage auf diesem Forschungsgebiet reicht nicht aus, um diesbezüglich eindeutige Aussagen zu treffen. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Levan und Levan-FOS das Wachstum probiotischer Mikroorganismen fördern (Marx *et al.* 2000; Porrás-Domínguez *et al.* 2014; Adamberg *et al.* 2015), ein direkter Kultur-basierter Vergleich der beiden Fruktan-Gruppen wurde jedoch bis dato nicht durchgeführt.

## 4.2 Charakterisierung Levan-abbauender Enzyme

Wie in der Literatur beschrieben und in dieser Arbeit unter Verwendung der rekombinanten Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 experimentell bestätigt werden konnte, akkumulieren Levansucrasen im Zuge ihrer katalytischen Aktivität polymeres Levan. Die polymere Form des  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktans erschwert ein Downstream-Processing entsprechender Prozesse erheblich, da es die Viskosität der Prozesslösung stark erhöht. Industrielle Verfahren wie Nanofiltration oder chromatographische Separation können ohne ein Herabsetzen der Viskosität nicht für die Aufreinigung der Reaktionsprodukte eingesetzt werden. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit Enzyme identifiziert und charakterisiert werden, die polymeres Levan in kurzkettenige Fruktooligosaccharide hydrolysieren. FOS können durch etablierte Verfahren im großtechnischen Maßstab aufgereinigt werden (Kuhn et al. 2010; Kuhn & Filho 2010; Nobre et al. 2010; Kuhn et al. 2014) und weisen darüber hinaus präbiotische Eigenschaften auf. Für die Evaluation der enzymatischen Hydrolyse-Produkte wurde dieser Arbeit die Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates zugrunde gelegt, die besagt, dass nur Kohlenhydratpolymere, die aus drei oder mehr Monomer-Einheiten bestehen, als präbiotischer Ballaststoffe deklariert werden dürfen. Drei Endolevanasen wurden für diesen Zweck heterolog in *E. coli* NEB5-alpha produziert und hinsichtlich ihrer hydrolytischen Eigenschaften charakterisiert. Bei den Enzymen handelte es sich um die bereits charakterisierte Endolevanase BT1760 aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 sowie die uncharakterisierten Endolevanasen LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* DSM 13 und LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286. Qualitative Assays auf Basis von Levan, welches mit Hilfe der rekombinanten Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 hergestellt wurde, konnten zeigen, dass alle drei Enzyme in der Lage waren polymeres Levan zu hydrolysieren. Nach ausreichender Inkubationszeit führte die Aktivität aller drei Endolevanase dazu, dass nach Ethanol-Zugabe kein sichtbares Präzipitat aus den angesetzten Lösungen ausgefällt werden konnte.

### 4.2.1 RBB-Levan – Substrat zur Charakterisierung von Endolevanasen

In der Glykochemie und -biologie konnten sich chromogene Substrate für die Charakterisierung von Hydrolasen etablieren. Dabei ermöglicht die Kopplung geeigneter Farbstoffe an Kohlenhydrate eine photometrische Detektion der im Zuge von enzymatischen Reaktionen freigesetzten Reaktionsprodukte. Häufig wird dafür eine Kopplung an den Anthrachinon-Farbstoff Remazol Brilliant Blau R (RBB) durchgeführt, wie im Falle der etablierten Substrate RBB-Inulin (Castro et al. 1995), RBB-Xylan (Biely et al. 1988) und RBB-Cellulose (Boyer & Redmond 1983). Der Vorteil dieser Verbindungen ist, dass diese durch Zugabe von Ethanol aus entsprechenden Lösungen ausgefällt werden können, wodurch ein klarer, ungefärbter Überstand entsteht. Die durch die enzymatische Aktivität spezifischer Hydrolasen freigesetzten FOS sind hingegen in Ethanol löslich und verleihen dem Fällungsüberstand eine intensive Blaufärbung. Durch diskontinuierliche Beprobung eines entsprechenden Assays, Ausfällung des kolorimetrischen Substrates und anschließende Absorptionsmessung des Überstandes, kann die enzymatische Aktivität von Hydrolasen bestimmt werden.



Da keine kommerzielle Verfügbarkeit für kolorimetrische Substrate auf Levan-Basis besteht, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich polymeres Levan, welches mit Hilfe der rekombinanten Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 produziert wurde, mit RBB koppelt lässt. Orientiert wurde sich dabei an dem Syntheseprotokoll von Castro und Kollegen (Castro et al. 1995). Durch das in Kapitel 2.6.3 Synthese und Aufreinigung von RBB-Levan<sup>3</sup> beschriebene Protokoll konnte ein wasserlösliches, tiefblaues Material generiert werden, welches sich durch Ethanol-Zugabe präzipitieren ließ. Im Anschluss an die saure Hydrolyse des Präzipitates konnten chromatographische Analysen verifizieren, dass es sich bei dem blau gefärbten Material um ein Fruktan-Polymer handelte. Ein Teil der Lösung, die für die saure Hydrolyse eingesetzt worden war, wurde parallel für eine photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm eingesetzt. Aufgrund des spezifischen Extinktionskoeffizienten von RBB von  $\epsilon_{592} = 6,170 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  konnte die RBB-Stoffmenge in der erwähnten Lösung bestimmt und durch einen Vergleich mit den chromatographisch quantifizierten Fruktose-Äquivalenten der Kopplungsgrad des RBB-Levan bestimmt werden, der bei 0,15 % lag.

Eine enzymatische Hydrolyse des eigens synthetisierten RBB-Levans konnte bestätigen, dass das ausgefällte Material aus  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Fruktose-Einheiten bestand. Dabei zeigten sich, abhängig von der verwendeten Endolevanase, große Unterschiede in der Zunahme der im Fällungsüberstand nachgewiesenen Absorption. Unter Verwendung der Endolevanasen BT1760 und LevB<sub>1</sub> deutete die Zunahme der im Überstand gemessenen Blaufärbung darauf hin, dass diese Enzyme kurzkettige FOS aus dem gefärbten, polymeren Levan freisetzen. Dabei verlief die Freisetzung im Fall des Enzyms LevB<sub>1</sub> deutlich langsamer als für die Endolevanase BT1760 aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079, was sich durch die geringe spezifische Aktivität von LevB<sub>1</sub> begründen lässt. Beim Einsatz der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 konnte keine Zunahme der Absorption beobachtet werden. Anders als unter Verwendung des polymeren Levans, welches enzymatisch durch die rekombinante Levansucrase LevS1417 produziert wurde und durch alle drei untersuchten Enzyme (LevB<sub>2286</sub>, BT1760 und LevB<sub>1</sub>) hydrolysiert werden konnte, waren lediglich LevB<sub>1</sub> und BT1760 in der Lage, das eigens synthetisierte RBB-Levan zu spalten.

Basierend auf der nachweisbaren Hydrolyse des synthetisierten RBB-Levan durch BT1760 und LevB<sub>1</sub> wurden weitere Untersuchungen mit BT1760 und dem kolorimetrischen Polymer durchgeführt. Diese deckten auf, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Absorptionszunahme bestand (Abbildung 35). Das Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9703$  deutete dabei auf eine hohe Validität des Messverfahrens hin. Durch den Einsatz variierender Enzymmengen sollte evaluiert werden, ob ein proportionales Verhältnis zwischen Absorptionsänderung pro Zeiteinheit und zugefügter Enzymmenge besteht. Zwar resultierte die Erhöhung des zugesetzten Eluat-Volumens in einer stärkeren Zunahme der Absorption über die Zeit, jedoch korrelierte die Intensivierung der Blaufärbung ( $\Delta\text{Absorption}_{595\text{nm}} \text{ min}^{-1}$ ) nicht proportional mit der Erhöhung der Enzymmenge. Aufgrund dieser ausbleibenden Korrelation wurde die Strategie, die Aktivität der Endolevanasen mit Hilfe von RBB-Levan zu bestimmen, verworfen. Dennoch stellt das gefärbte Levan ein vielversprechendes Substrat für die Charakterisierung

von Endolevanasen dar. Eine Optimierung des Synthese-Prozesses sowie der Assay-Zusammensetzung könnte dazu beitragen, die ausbleibende Korrelation zwischen eingesetztem Enzym und Absorptionsänderung herbeizuführen.

Wie durch die chromatographischen Analysen, die im nächsten Kapitel diskutiert werden, verifiziert wurde, war auch die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> zur Hydrolyse von polymerem Levan befähigt. Die Tatsache, dass das Enzym keinerlei Aktivität gegenüber dem synthetisierten RBB-Levan zeigte, könnte darauf hindeuten, dass das Enzym möglicherweise einen einzigartigen Reaktionsmechanismus besitzt, der sich von den Endolevanasen BT1760 und LevB<sub>1</sub> unterscheidet. Wie bereits erwähnt wurde, weisen Levansucrasen große Unterschiede hinsichtlich des ausgeführten Elongationsmechanismus auf und können demnach in prozessive und nicht-prozessive Levansucrasen unterteilt werden. Strukturell weisen Levansucrasen (GH68 Familie) und Endolevanasen (GH32 Familie) große Übereinstimmungen auf, da beide über eine charakteristische Propeller-Domäne verfügen und daher in den gleichen Glykosid-Hydrolasen Clan (GH-J) eingeordnet werden. Zusätzlich zur Propeller-Domäne verfügen Endolevanasen über ein  $\beta$ -Sandwich, das sich aus zwei Schichten á sechs  $\beta$ -Strängen zusammensetzt (Ernits et al. 2019). Obwohl der Elongationsmechanismus von Levansucrasen bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Raga-Carbajal et al. 2016; Raga-Carbajal et al. 2018), wird vermutet, dass strukturspezifische Merkmale der Propeller-Domäne bestimmen, ob Levansucrasen nach dem prozessiven oder nicht-prozessiven Mechanismus arbeiten. Die Tatsache, dass diese Domäne auch bei Endolevanasen vorliegt, gibt Grund zur Annahme, dass Proteine dieser Enzymklasse ebenfalls über variierende, hydrolytische Mechanismen verfügen könnten. Der nicht-prozessive Elongationsmechanismus von Levansucrasen ist durch eine kontinuierliche Assoziation und Dissoziation der im Reaktionsverlauf gebildeten Intermediate aus dem aktiven Zentrum charakterisiert. Bei Enzymen, die nach dem prozessiven Mechanismus fungieren, besteht dagegen über längere Zeit ein stabiler Komplex aus Enzym und der sukzessiv verlängerten Fruktankette (Raga-Carbajal et al. 2016). Überträgt man diese Beobachtungen auf Endolevanasen, so lässt sich die Hypothese aufstellen, dass auch dort ein prozessiver und ein nicht-prozessiver Mechanismus in der hydrolytischen Reaktion auftreten könnte, der vom Enzym katalysiert wird. Diese Theorie könnte erklären, warum die in dieser Arbeit untersuchte Endolevanase LevB<sub>2286</sub> keine hydrolytische Aktivität auf das modifizierte RBB-Levan ausübte. Geht man davon aus, dass LevB<sub>2286</sub> aufgrund spezifischer, struktureller Eigenschaften einen Komplex mit der Levan-Kette ausbildet, würden die an das Polymer gekoppelten RBB-Moleküle eine prozessive oder kontinuierliche Aktivität des Enzyms verhindern. Anders wäre es bei Enzymen, die nur temporär mit dem Substrat assoziieren und sich nach erfolgter Spaltung von diesem ablösen. Enzyme, die nach solch einem Mechanismus arbeiten, wären in der Lage, in einer nicht-prozessiven Reaktion das colorimetrische Levan zwischen den RBB-Modifikationen zu binden und vollständig zu hydrolysieren.

#### **4.2.2 Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahrens zur Analyse von Fruktooligosacchariden**

Nachdem sich das eigens synthetisierte RBB-Levan für die Analyse der rekombinanten Endolevanasen als ungeeignet erwies, wurde die Etablierung eines analytischen Nachweisverfahrens für Fruktooligosaccharide erforderlich. Gegenwärtig sind die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulstem amperometrischem Detektor (HPAEC-PAD) die gebräuchlichsten chromatographischen Methoden für die qualitative und quantitative Analyse von Kohlenhydraten (Sangeetha et al. 2005). Aufgrund der Tatsache, dass zum Start dieser Arbeit ein Smartline-HPLC-System der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) zur Verfügung stand, wurden verschiedene HPLC-Trennsäulen hinsichtlich ihrer Trennleistung für FOS evaluiert. Die Detektion der Zucker wurde dabei durch einen Brechungsindexdetektor gewährleistet. Erste Untersuchungen erfolgten unter Verwendung der Trennsäulen HPX-42A und HPX-42C (Bio-Rad; Feldkirchen, Deutschland), bei denen es sich um Polymer-basierte Säulen handelt, die Substanzen nach dem Prinzip der ionenmoderierten Verteilungschromatographie auftrennen. Als Standard für die chromatographischen Analysen diente ein kommerzielles Gemisch aus Inulin-FOS (Megazyme; Bray, Irland), welches sich laut Hersteller aus den DPs 2 – 8 zusammensetzte. Die Säule HPX-42C, die laut Bio-Rad eine hochauflösende Trennung von Oligosacchariden bis zu einem DP von 10 ermöglicht, erwies sich für die beabsichtigte Applikation als ungeeignet. Der bei der Trennung von Oligosacchariden primär wirkende Mechanismus der Größenausschlusschromatographie ermöglichte nicht ansatzweise eine Basislinie-getrennte Separierung der einzelnen DPs (nicht dargestellt). Durch die Aminex HPX-42A, die im Gegensatz zur Aminex HPX-42C (Kalzium-Form) eine Silber-Form aufweist, konnten deutlich bessere Resultate erzielt werden. Die einzelnen DPs des kommerziellen FOS Gemischs wurden voneinander separiert, jedoch nur mit geringer Auflösung, da für alle Substanzen über DP2 keine Basislinien-getrennte Auftrennung erzielt wurde. Bei ersten Analysen von enzymatisch aus Levan freigesetzten FOS wurde ein großer Nachteil des Säulensetups aufgedeckt. So zeigte sich, dass das im Zuge der Probenaufbereitung in die Probenmatrix eingebrachte Ethanol ebenfalls durch den RI-Detektor detektiert wurde und bedingt durch die hohe Konzentration ein entsprechend großes Signal erzeugte. Aufgrund des geringen Molekulargewichts penetriert Ethanol das Säulenmaterial der Aminex HPX-42A und co-eluierte mit dem Monosaccharid Fruktose nach etwa 39 Minuten. Um eine Quantifizierung der Fruktose zu ermöglichen, wurde das in den Proben befindliche Ethanol mit Hilfe des Rotations-Vakuum-Konzentrators RVC 2-25 CDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; Osterode am Harz, Deutschland) entfernt und die aufkonzentrierte Probenmatrix in H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> gelöst. Dieser Schritt verlängert die Quantifizierung der Reaktionsprodukte enorm und lieferte bei einem nicht vollständigen Verdampfen des Ethanols eine Überbestimmung der Fruktose-Konzentration. Dieser Umstand sowie die geringe Auflösung, die durch die Aminex HPX-42A erreicht wurde, machte die Evaluierung alternativer Säulenkonfigurationen notwendig.

Wie in der Literatur beschrieben wird, kann eine hochauflösende, chromatographische Analyse von Fruktooligosacchariden durch den Einsatz von Aminophasen realisiert werden (Churms 1996; Lin & Lee 1998; Rodríguez-Gómez et al. 2015). Die Trennleistung drei verschiedener Aminophasen-Trennsäulen wurde daher in dieser Arbeit untersucht. Durch Analysen mit der Eurospher II 100-3 NH2 (250 x 40 mm; Knauer GmbH; Berlin, Deutschland) konnte eine hochauflösende Auftrennung Inulin-basierter FOS erzielt werden (Abbildung 28). Die geringe Partikelgröße von 3  $\mu\text{m}$  und die damit verbundene hohe Trennböden-Zahl führte jedoch zu einer unnötig langen Analyse-Zeit. Das Pentasaccharid 1,1,1-Kestopentaose eluierte beispielsweise erst nach 32 Minuten. Durch die Erhöhung des Laufmittel-Wasseranteils auf 35 % [v/v] konnte die Retention der Analyten und somit auch die Analyse-Zeit auf unter 15 Minuten reduziert werden. Da bei der enzymatischen Hydrolyse von Levan deutlich längere FOS-DPs generiert werden können (Mardo et al. 2017), wurde die Trennleistung einer Eurospher Trennsäule mit größerem Partikeldurchmesser (5  $\mu\text{m}$ ) geprüft. Mit steigendem Partikeldurchmesser sinkt die Anzahl an Trennböden, die Zucker können die Säulenmatrix schlechter lateral penetrieren, wodurch es zu verringerten Retentionszeiten kommt (Carr et al. 2009). Dieser Effekt zeigte sich bei der Auftrennung der Inulin-FOS deutlich, da die fünf Zucker mit variierendem DP in unter sieben Minuten von der Säule eluierten, was einen sehr hohen Probendurchsatz und die Auftrennung langkettiger FOS ermöglichte. Aufgrund der schnellen, hochauslösenden Trennleistung wurde die Eurospher II 100-5 NH2 (250 x 40 mm; Knauer GmbH; Berlin, Deutschland) für die Charakterisierung Levan-hydrolysierender Enzyme verwendet.

Obwohl sich Aminophasen hervorragend für die Analyse von Kohlenhydraten eignen, weist dieser Säulentyp zwei Defizite auf, die sich negativ auf die Lebenszeit der Säule auswirken. Einer dieser Nachteile ist die hohe Reaktivität der terminalen Aminogruppen, die mit Aldehyden und Ketonen Schiff'sche Basen ausbilden können, was zu einer irreversiblen Adsorption der Analyten führt. Des Weiteren ist das Silica-Rückgrat der Säulen anfällig gegenüber hohen pH-Werten (Tanaka et al. 2003). Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden und äußerte sich mit steigender Analysenzahl in Form von abnehmenden Retentions- und Auflösungsdaten. Um eine hohe Daten-Validität und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurde daher ein weiterer Säulentyp untersucht. Bei der Asahipak NH2P-50 3E Trennsäule (Showa Denko K.K.; Tokio, Japan) handelt es sich um eine Polymer-basierte Aminophase, deren Rückgrat sich aus einem Polyvinyl-Alkohol-Polymer zusammensetzt. Dieses Polymer bietet eine verbesserte chemische Stabilität gegenüber Kieselgel-basierten Säulen, wodurch die Säule ohne Auflösungsverlust in einem pH-Bereich zwischen pH 2 und pH 13 betrieben werden kann. Die Asahipak Trennsäule lieferte vergleichbare Auflösungs- und Retentionswerte wie die Silica-basierten Trennsäulen der Knauer GmbH, zeigte jedoch eine deutlich höhere Stabilität, was zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit beitrug. Aus diesem Grund wurde die Asahipak NH2P-50 3E als geeignetste Säule für die beabsichtigte Auftrennung von Fruktooligosacchariden eingeordnet.

### 4.2.3 Produktspektren rekombinanter Endolevanasen

Auf Basis der etablierten, chromatographischen Nachweismethode konnten die Produktspektren der rekombinanten Endolevanasen aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079, *B. licheniformis* DSM 13 und *A. chroococcum* DSM 2286 detailliert aufgeklärt werden. Anders als unter Verwendung von RBB-Levan wurde durch den Einsatz von pflanzlichem Levan bestätigt, dass alle drei Enzyme in der Lage waren, das  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktan-Polymer Levan zu hydrolysieren (Abbildung 36). Dabei offenbarte die in dieser Arbeit erstmals charakterisierte Endolevanase aus *A. chroococcum* DSM 2286 einzigartige, hydrolytische Eigenschaften. Das Enzym produzierte ausgehend von Timothy Gras Levan-FOS mit einem DP zwischen 2 und 8 und geringe Mengen monomerer Fruktose. Nach Umsetzung des supplementierten Levans fanden sich etwa 85 % der aus dem Levan freigesetzten Fruktose-Einheiten in FOS mit einem DP  $\geq 3$  wieder. Diese Produkte dürfen entsprechend der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates als präbiotische Ballaststoffe deklariert werden. Ein ähnliches Produktspektrum wurde in der Literatur bereits für die Endolevanasen aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 (Mardo et al. 2017), *B. licheniformis* DSM 13 (Porrás-Domínguez et al. 2014) und *Bacillus* sp. L7 (Miasnikov 1997) beschrieben. Im Gegensatz zu diesen Endolevanasen besitzt LevB<sub>2286</sub> jedoch eine deutlich höhere spezifische Aktivität, wie die enzymatische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms aufdeckte. Wie Tabelle 31 verdeutlicht, hebt sich LevB<sub>2286</sub> mit einem  $V_{\max}$  von  $6685 \pm 224 \text{ U mg}^{-1}$  deutlich von bisher Endolevanasen ab.

Tabelle 31: Überblick über die spezifischen Aktivitäten Levan-hydrolysierender Enzyme. Die Liste basiert auf der Publikation von Zhang et al. (2019).

Enzym	Organismus	Spez. Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	Referenz
LevB <sub>2286</sub> *	<i>Azotobacter chroococcum</i> DSM 2286	6685	Diese Arbeit
LevB <sub>1</sub> *	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	36	Diese Arbeit
LevB <sub>1</sub> *	<i>Bacillus licheniformis</i> IBt1	1.8	(Porrás-Domínguez et al., 2014)
BT <sub>1760</sub> *	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	333	Diese Arbeit
BT <sub>1760</sub> *	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	310	(Mardo et al. 2017)
LevB*	<i>Bacillus subtilis</i> 168	3	(Jensen et al. 2016)
LevB*	<i>Bacillus</i> sp. L7	128	(Miasnikov 1997)
LevB*	<i>Bacillus</i> sp. No. 71	21.7	(Murakami et al. 1992)
LevB	<i>Pseudomonas</i> sp. No. 43	30.5	(Kang et al. 1999)
LevB	<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 19246	851	(Igarashi et al. 1987)
LevB	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	29.4	(Tanaka et al. 1989)

\* Levan-abbauende Enzyme mit endo-Reaktionsmechanismus

Von den Levan-abbauenden Enzymen mit endo-artigem Reaktionsmechanismus zeigte die Endolevanase BT1760 aus *B. thetaiotaomicron* DSM 2079 mit  $310 \text{ U mg}^{-1}$  die bisher höchste spezifische

Aktivität (Mardo et al., 2017). Neben der ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten Deletion des N-terminalen Signalpeptids erweiterten die Wissenschaftler um Karin Mardo den C-Terminus von BT1760 zwecks Aufreinigung mit einem Poly-Histidin-Tag. Trotz der N-terminalen Modifikation, zeigte die in dieser Studie untersuchte verkürzte Version von BT1760 nahezu identische Aktivitätswerte ( $333 \text{ U mg}^{-1}$ ). Insgesamt war die spezifische Aktivität der hier untersuchten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> 20-mal höher als die spezifische Aktivität von BT1760. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass ein einheitlicher Vergleich der Endolevanase-Aktivitäten aufgrund der vielseitigen Produktspektren nur bedingt möglich ist. Im Fall von Exolevanasen ist der quantitative Nachweis der freigesetzten Fruktose-Einheiten eine valide Methode zur Aktivitätsbestimmung. In diesem Zusammenhang ist die Bestimmung der freigesetzten Fruktose-Äquivalente zu einer Methode der Wahl für Levanasen mit endo-artigem Reaktionsmechanismus geworden (Kasperowicz et al., 2010; Porrás-Domínguez et al., 2014). Dieser Ansatz ist jedoch aufgrund der Variabilität des Polymerisationsgrads der Hydrolyse-Produkte nicht ideal. Neben der hohen Aktivität zeigte sich für die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> ein weiteres Alleinstellungsmerkmal. Wie der Reaktionsverlauf der rekombinanten Endolevanasen zeigte (Abbildung 38), benötigte das Enzym unter den gegebenen Reaktionsbedingungen etwa drei Stunden, um das supplementierte Levan zu hydrolysieren. Die Reaktion wurde für 20 weitere Stunden verfolgt, wodurch offenbart wurde, dass LevB<sub>2286</sub> in dieser Zeit nahezu keine relevanten Mengen an Fruktose und Levanbiose freisetzte. Innerhalb der verlängerten Inkubation stieg der relative Anteil der unerwünschten Produkte Fruktose und Levanbiose an den Reaktionsprodukten von 15,3 % auf 23,6 %. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich ebenfalls unter Verwendung von bakteriellem Levan, das mit Hilfe der rekombinanten Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 produziert wurde. Im Vergleich dazu lag der Anteil der unerwünschten Produkte Fruktose und Levanbiose an den Gesamtprodukten bei den beiden ebenfalls untersuchten Endolevanasen BT1760 und LevB<sub>1</sub> deutlich höher. Nach Ablauf der verlängerten Inkubation belief sich deren relativer Anteil auf 38,7 % (BT1760) und 65,7 % (LevB<sub>1</sub>).

Das einzigartige hydrolytische Verhalten bei verlängerter Inkubation untermauert die im vorherigen Kapitel aufgestellte Hypothese des prozessiven Hydrolyse-Mechanismus der Endolevanase aus *A. chroococcum* DSM 2286. Wie die chromatographische Analyse der Reaktionsprodukte zeigte, schien das untersuchte Enzym nur bedingt in der Lage zu sein, FOS mit einem DP < 6 als Substrat für die enzymatische Hydrolyse zu verwenden (Abbildung 37). Die Tatsache, dass bei der durch Endolevanasen katalysierten Reaktion bereits im frühen Reaktionsverlauf kurzkettige FOS entstehen, deutet darauf hin, dass die Enzyme vorwiegend an den Enden der Levan-Ketten arbeiten. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Sättigungskurve, die im frühen Verlauf der Reaktion die stärkste Steigung aufweist. Eine solche Sättigungskurve, die nachfolgend in Abbildung 56A dargestellt ist, konnte in dieser Arbeit und auch in der Literatur für die Endolevanase-vermittelte FOS-Freisetzung beobachtet werden (Porrás-Domínguez et al. 2014; Mardo et al. 2017). Würden die Enzyme dieser Enzymklasse vorwiegend zentrale Bindungen des Polymers hydrolysieren, würde die FOS-Freisetzung einen exponentiellen

Charakter vorweisen, da es aufgrund des extremen Molekulargewichts von Levan erst im späten Verlauf zu einer Freisetzung kurzkettiger FOS käme (Abbildung 56B).

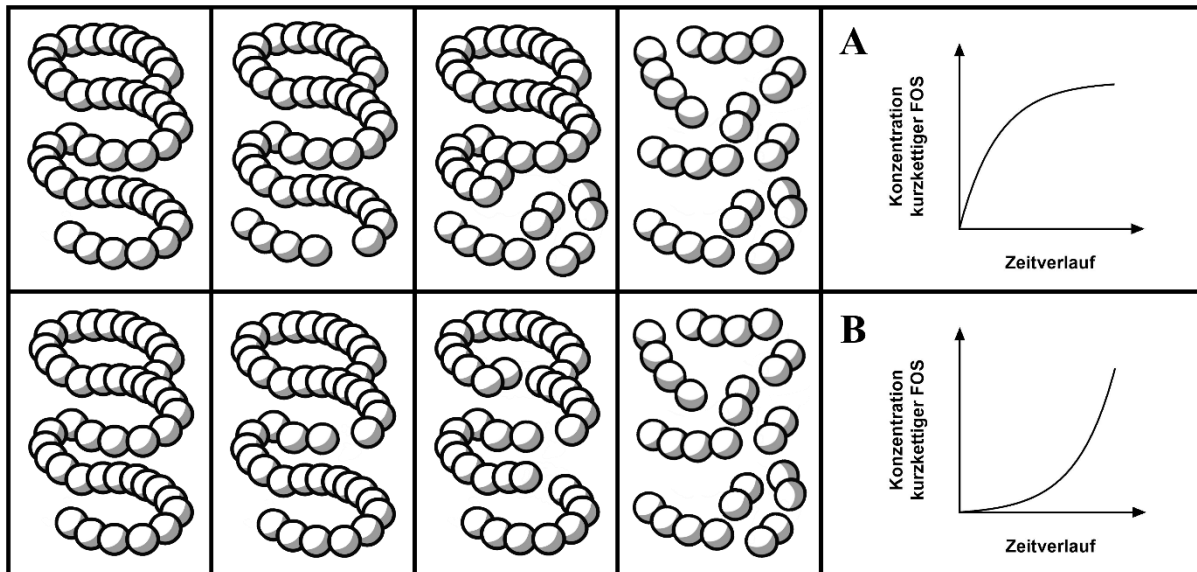


Abbildung 56: Visuelle Darstellung der durch Endolevanasen katalysierten Hydrolyse von Levan. Bei den dargestellten Mechanismen und Graphen handelt es sich um hypothetische Modelle. Modell A beschreibt einen Mechanismus, bei dem die Levan-Hydrolyse am Ende des Moleküls stattfindet, während es bei Modell B zu einer Hydrolyse in zentralen Bereichen des Polymers kommt.

Möglicherweise bildet die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 einen stabilen Komplex mit dem Levan-Polymer aus, läuft die Fruktan-Kette entlang und setzt in unregelmäßigen Abständen FOS oder Fruktose frei. Das Enzym scheint aufgrund sterischer Gründe nicht oder nur in sehr geringem Maße in der Lage zu sein, die in diesem Prozess freigesetzten FOS erneut als Substrat zu verwenden. Die Beobachtung, dass die produzierten FOS auch bei verlängerter Inkubation auf einem konstant hohen Konzentrationsniveau bleiben, deutet darauf hin, dass LevB<sub>2286</sub> kurzkettige FOS nur bedingt hydrolysieren kann. Dieses für LevB<sub>2286</sub> beobachtete Phänomen ist einzigartig, da bisher nahezu alle in der Literatur beschriebenen Levan-hydrolysierenden Enzyme eine Hydrolyse der gebildeten FOS bei elongierter Inkubation zeigten, was zu einem kontinuierlichem Anstieg der Fruktose- und Levanbiose-Konzentration führte (Zhang et al. 2019). Ein entsprechender Anstieg konnte auch für die in dieser Arbeit untersuchten Endolevanasen LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* DSM 13 und BT1760 aus *B. thaitotaomicron* DSM 2079 nachgewiesen werden.

In Bezug auf die industrielle Applikation zur Produktion von Levan-basierten FOS erwies sich LevB<sub>2286</sub> nach Abschluss der enzymatischen Charakterisierung als geeignet. Das Enzym zeigte bis zu einer Temperatur von 45 °C Aktivität und ist an einen leicht sauren pH angepasst, da das Protein bei einem pH von 6 optimale Aktivität aufwies.

Von Mitgliedern der Gattung *Azotobacter* ist bekannt, dass sie verschiedene Oberflächenpolymere wie Alginat, Levan und Cellulose produzieren (Núñez, Moreno, Soberón-Chávez, & Espín, 1999; Sadoff, 1975). Diese Polymere sind vermutlich Bestandteile von austrocknungsresistenten Zysten, die Schutz

für die Nitrogenase und andere potenziell O<sub>2</sub>-empfindliche Proteine bieten (Sabra, Zeng, Lunsdorf, & Deckwer, 2000). Laut Annotation kodiert das im Genom von *A. chroococcum* DSM 2286 enthaltene Gen *sacB* (GenBank-Eintrag: EV691\_101303) für eine Levansucrase, die wahrscheinlich für die Levan-Synthese verantwortlich ist. Das Gen, das für die in dieser Arbeit untersuchte Endolevanase (GenBank-Eintrag: EV691\_101302) kodiert, befindet sich in der direkten genomischen Umgebung von *SacB*. Es ist daher wahrscheinlich, dass *sacB* und *levB2286* ein funktionales Operon ausbilden. Laut Annotation handelt es sich beim Genprodukt von EV691\_101302 um eine Levanbiose-produzierende Levansucrase der Enzymklasse 3.2.1.64. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, gehört die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> jedoch zu den Endolevanasen der Enzymklasse 3.2.1.65. Diese Diskrepanz verdeutlicht, dass die Computerbasierte, automatische Annotation für Levan-abbauende Enzyme nicht ausreicht, um klare Aussagen über die Enzymfunktion zu treffen. Hier müssen biochemische Charakterisierungen erfolgen, um die Enzym-Funktionen und -Aktivitäten zu bestimmen.

### 4.3 Extrakt-basierte Produktion Levan-basierter FOS

Die Charakterisierung der rekombinanten Enzyme LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 und LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 lieferte wichtige Erkenntnisse über die Merkmale der heterolog produzierten Proteine und bestätigte, dass beide Proteine ertragreich in *E. coli* produziert werden können. Beide Enzyme zeigten hohe spezifische Aktivitäten und vorteilhafte hydrolytische Eigenschaften für die beabsichtigte Produktion von präbiotischen FOS mit einem DP  $\geq 3$ . Unter Verwendung der Aminophasen-Trennsäulen wurde durch HPLC-Analysen gezeigt, dass die Levansucrase aus *G. japonicus* LMG 1417 ausgehend von Saccharose relevante Mengen kurzkettiger FOS produziert. Zeitgleich kam es aber auch zur Akkumulation von polymerem Levan, welches die Viskosität entsprechender Reaktionslösungen stark erhöhte und eine Probenaufbereitung erschwerte. Die Charakterisierung der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> legte offen, dass das Enzym in der Lage ist, Levan schnell in kurzkettige FOS zu überführen, was mit einer Reduktion der Viskosität der Reaktionslösung einherging. Durch den simultanen Einsatz beider Enzyme in einem gemeinsamen Reaktionsansatz sollte überprüft werden, ob die Aktivität beider Enzyme genutzt werden kann, um Saccharose direkt in Levan-basierte FOS umzusetzen.

#### 4.3.1 Extrakt-basierte Produktion Levan-artiger FOS

Bevor die simultane Aktivität der Levansucrase LevS1417 und Endolevanase LevB<sub>2286</sub> untersucht wurde, erfolgte eine Produktion Levan-basierter FOS unter Verwendung von *E. coli* NEB5-alpha Roh-Zellextrakt. Der Einsatz von Zellextrakt umgeht die kosten- und zeitaufwendige Aufreinigung rekombinanter Proteine durch geeignete Reinigungsverfahren. Die in dieser Arbeit durchgeführte Strep-Tactin-Affinitätschromatographie eignet sich zwar im Labormaßstab für eine schnelle und zuverlässige Aufreinigung rekombinanter Enzyme, im industriellen Maßstab würde dieses Verfahren die Prozesskosten jedoch drastisch erhöhen. Um die kostenintensive Aufreinigung zu umgehen, sollte daher analysiert werden, ob die in dieser Arbeit untersuchten Endolevanasen in Form von *E. coli* Zellextrakt



ähnliche Produktspektren generieren wie in aufgereinigter Form. Zellfreie Bio-Prozesse werden in der Industrie bereits für zahlreiche Produktionen eingesetzt und ersetzen vermehrt Zell-basierte Fermentationen (Rollin et al. 2013). Vor mehr als 100 Jahren nutzte der deutsche Chemiker Eduard Alois Buchner Zell-freien Extrakt von Hefezellen zur Produktion von Ethanol und ebnete damit den Weg für einen bis heute etablierten Zweig in der Biotechnologie (Buchner 1897). Im Jahr 1907 erhielt er für diese Errungenschaft den Nobelpreis in Chemie. Zell-freie Prozesse haben zahlreiche Vorteile gegenüber Prozessen, die auf lebenden Mikroorganismen basieren, darunter erhöhte Ausbeuten (Ye et al. 2009), eine verbesserte Prozesssteuerung (Carlson et al. 2012) und eine höhere Toleranz gegenüber toxischen Substanzen (Wang et al. 2011) und Produkten (Guterl et al. 2012). Eines der bekanntesten industriellen Beispiele für die zell-freie Biotechnologie ist die Isomerisierung von Glukose zu Fruktose durch den Einsatz von Glukose-Isomerasen. Durch Mutagenese wurden die in heutigen Prozessen verwendeten Glukose-Isomerasen derart stabilisiert, dass eine Aufreinigung der Enzyme nicht mehr notwendig ist. Zwecks Wiederverwendbarkeit erfolgt dennoch häufig eine Immobilisierung des Enzyms, indem Zell-Rohextrakt über ein spezielles Trägermaterial geleitet wird, an der die Glukose-Isomerase adsorbiert. In dieser Form kann das Enzym als kostengünstiger und wiederverwendbarer Biokatalysator dienen (Bhosale et al. 1996).

Um die Vorteile der Zell-freien Biotechnologie auf die beabsichtigte Produktion Levan-basierter FOS zu übertragen, wurde ausgehend von den Stämmen *E. coli* pASK5\_levB2286, *E. coli* pASK5\_levB\_Blic und *E. coli* pASK5\_bt1760 (Kapitel 2.2.3) Zell-Extrakt hergestellt. Alle drei Extrakte produzierten ausgehend von polymerem Levan kurzkettige FOS, wie chromatographisch durch HPLC-Analysen nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.6.1). Die im Zuge der enzymatischen Hydrolyse generierte Produktspektren ähnelte den Produktspektren, die ausgehend von aufgereinigten Enzymen erzeugt wurden. Dies implizierte, dass die rekombinanten Enzyme nicht durch die zelleigenen Proteine des Produktionsorganismus *E. coli* NEB5-alpha negativ beeinflusst wurden und der Produktionsorganismus selbst keine Enzyme produziert, die das  $\beta$ -2,6-glykosidische Fruktanpolymer Levan hydrolysieren. BlastP-Analysen gegen das Genom von *E. coli* DH5 $\alpha$  konnten keine Hydrolasen identifizieren, die eine ausreichende Sequenzübereinstimmung zu der hier untersuchten Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aufwiesen. Die höchste Übereinstimmung erzielte mit einer Query-Cover von 6 % und einer Übereinstimmung von 37,5 % die Protein-Deglycase YajL. Dieses Enzym katalysiert den Abbau von Maillard-Addukten, die sich zwischen den Aminogruppen von Proteinen oder Nukleotiden und reaktiven Carbonylgruppen von Glyoxalen ausbilden können (Abdallah et al. 2016).

### **4.3.2 2-Stamm-System: Extrakt-basierte Produktion Levan-artiger FOS aus Saccharose**

Die Ergebnisse der Extrakt-basierten FOS-Produktion bestätigten die Funktionalität der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> in dem produzierten Extrakt-System. Um ausgehend von Saccharose eine skalierbare Produktion Levan-basierter FOS zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt der Endolevanase-haltige

Extrakt mit einem Levansucrase-haltigen Extrakt vereint und in eine entsprechende Reaktion eingesetzt. Als Produktionsorganismus für den Levansucrase-haltigen Extrakt diente *E. coli* NEB5-alpha pASK5\_levS1417. Die simultane Aktivität der beiden Rohextrakte führte, ausgehend von Saccharose, direkt zur Produktion Levan-basierter FOS (Abbildung 42). Mit einer Effizienz von 59,5 % wurden die in der Saccharose-enthaltenen Fruktose-Einheiten in FOS mit einem Polymerisierungsgrad  $\geq 3$  eingebaut. Anders als bei den zuvor untersuchten Einzelreaktionen wurden in dem untersuchten 2-Stamm-System relevante Mengen monomerer Fruktose freigesetzt. Zum Zeitpunkt der letzten Probenahme wurde eine Fruktose-Konzentration von 36,9 mM detektiert, was einem relativen Anteil an den freigesetzten Fruktose-Äquivalenten von 42,2 % entsprach. Dieser vergleichsweise hohe Wert lässt sich zurückführen auf die geringe Saccharose-Konzentration (85 mM), die für die Extrakt-basierte Reaktion eingesetzt wurde. Für Levansucrasen ist bekannt, dass die Konzentration des Substrates Saccharose große Auswirkungen auf das Verhältnis aus Transfruktosylierungs- und Hydrolyse-Aktivität hat. Bei geringeren Konzentrationen arbeitet das Enzym vermehrt hydrolytisch und spaltet Saccharose in die monomeren Untereinheiten Fruktose und Glukose. Erhöht man die Saccharose-Konzentration, sinkt die hydrolytische Aktivität, wodurch der relative Anteil der Transfruktosylierungsprodukte Levan und FOS zunimmt (Chambert et al. 1974; Tian & Karboune 2012; Santos-Moriano et al. 2015). Der beabsichtigten Produktion präbiotischer FOS kommt dieses Phänomen zugute, da eine Maximierung der Substrat-Konzentration eine Maximierung der erwünschten Reaktionsprodukte zur Folge hat.

Trotz der vergleichsweise hohen Fruktose-Konzentration, die im Zuge der enzymatischen Reaktion freigesetzt wurde, konnte die Funktionalität des 2-Stamm-Systems bestätigt werden. Das kritische Element der Viskositätserhöhung wurde durch die simultane Levansucrase/Endolevanase-Aktivität umgangen, was zeitgleich zur Produktion präbiotischer FOS führte. Diese können im industriellen Maßstab unproblematisch durch Verfahren wie Nanofiltration (Kuhn et al. 2010), Festbett-Säulen-Chromatographie (Kuhn & Filho 2010; Kuhn et al. 2014) oder die moderne SMB-Technologie (Nobre et al. 2010) aufgereinigt werden.

### **4.3.3 1-Stamm-System: Extrakt-basierte Produktion Levan-artiger FOS aus Saccharose**

Aufbauend auf den Ergebnissen zum zuvor diskutierten 2-Stamm-System erfolgten verschiedene Optimierungen, um die Handhabung der Extrakt-basierten FOS-Produktion zu vereinfachen und die generierten Ausbeuten zu erhöhen. Ein Ansatzpunkt zur Optimierung war die Reduktion der für die Extrakt-Produktion notwendigen Stämme, sprich, die Entwicklung eines 1-Stamm-Systems. Für diesen Ansatz wurde zunächst ein geeignetes Expressionsplasmid konstruiert, welches den Produktionsorganismus *E. coli* zur simultanen Produktion der rekombinanten Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> befähigt. Dafür wurde das Plasmid pASK5\_levS1417\_levB2286 erstellt (Kapitel 3.6.3.1 Konstruktion eines 1-Stamm-Systems zur heterologen Produktion von LevS1417 und LevB<sub>2286</sub>). Bei diesem Plasmid stehen beide Gene unter unabhängigen regulatorischen Elementen des pASK-IBA5

Vektors. Diese Elemente schließen den Promotor- und Operatorbereich, die RBS und die Transkriptions-Terminationssequenz ein. Nach Transformation des Plasmids in *E. coli* NEB5-alpha und Herstellung des entsprechenden Zellextraktes, wurde die Funktionalität des Expressionssystems untersucht. Um die Aktivität der beiden rekombinanten Enzyme im 1-Stamm-System-Extrakt nachzuweisen, wurden der produzierte Extrakt für einen entsprechenden Reaktionsansatz eingesetzt. Um die hydrolytische Aktivität der Levansucrase möglichst niedrig zu halten, wurde für die Assays eine gesättigte Saccharose-Lösung eingesetzt. Die chromatographische Auswertung der diskontinuierlich entnommenen Proben bestätigte, dass durch die Erhöhung der Substrat-Konzentration die hydrolytische Aktivität der im Extrakt befindlichen Levansucrase LevS1417 deutlich reduziert wurde. Aufgrund der zeitgleich wirksamen Endolevanase konnte die hydrolytische Aktivität der Levansucrase nicht valide bestimmt werden, da die hydrolytische Aktivität von LevB<sub>2286</sub> ebenfalls zur Freisetzung geringer Mengen Fruktose führte. Insgesamt lag der relative Anteil der freien Fruktose-Einheiten, die durch die hydrolytische Aktivität der beiden verwendeten Enzyme produziert wurde, bei 10,6 % der aus der Saccharose freigesetzten Fruktose-Einheiten. Unter Verwendung der deutlich erhöhten Substrat-Konzentration muss es im Zuge der bi-enzymatischen Reaktion zu einer Akkumulation von FOS der Formel GF<sub>n</sub> gekommen sein. Dieses Phänomen wurde bereits bei Assays mit der aufgereinigten Levansucrase LevS1417 (Kapitel 3.2.3 *In-vitro*-Levanproduktion durch die rekombinante Levansucrase LevS1417) und der Zell-freien Produktion von Levan-basierten Fruktanen beobachtet (Kapitel 3.3.5 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417). Zum Zeitpunkt der Assay-Durchführung war das chromatographische Nachweisverfahren auf Basis der Aminophasen-Trennsäulen noch nicht etabliert. Die für die Quantifizierung der Reaktionsprodukte verwendete Bio-Rad-Säule Aminex HPX-42A ermöglichte keine Differenzierung zwischen FOS mit F<sub>n</sub>- und GF<sub>n</sub>-Zusammensetzung. Die Gesamtheit der Produkte mit einem DP ≥ 3 wurde daher in Form von Fruktose-Äquivalenten quantifiziert. Diese Quantifizierungsmethode führte zu einer Überbestimmung der zum letzten Probenzeitpunkt nachweisbaren Fruktose-Einheiten (121 %) und entsprechend zu einer Unterbestimmung der nachweisbaren Glukose-Einheiten (79,6 %). Trotz der Fehlverteilung der Monomer-Einheiten, kann die Massen-Ausbeute der FOS valide bestimmt werden, da Glukose und Fruktose das gleiche Molekulargewicht aufweisen. Demnach lag die Ausbeute an FOS mit einem Polymerisierungsgrad ≥ 3 bei 498,6 g L<sup>-1</sup>. Bezogen auf das Substrat Saccharose zeigte die Extrakt-basierte Produktion (1-Stamm-System) eine Raum-Zeit-Ausbeute von 207,8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Dieser Wert lag deutlich über den Raum-Zeit-Ausbeuten die durch die Kultur-basierten Ansätze (6,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; Kapitel 3.3.2 *G. japonicus* LMG 1417 vs. *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417: Batch-Kultivierung), die Fermentationen (13 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; Kapitel 3.3.4 Fermentation von *G. japonicus* LMG 1417 und dem erstellten Überexpressionsstamm) und das Zell-freie Produktionssystem (9,85 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; Kapitel 3.3.5 Zell-freie Levan-Produktion durch Kulturüberstand von *G. japonicus* LMG 1417) auf Basis von *G. japonicus* LMG 1417 erzielt werden konnten.

Um die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses noch weiter zu steigern, wurde das Plasmid pASK5\_levS1417\_levB2286 in *E. coli* BL21 eingebracht (Jeong et al. 2016). Dieser Stamm eignet sich aufgrund der Defizienz der *lon*- und *ompT*-Proteasen für die heterologe Proteinproduktion und sollte gegenüber dem Klonierungsstamm *E. coli* NEB5-alpha höhere Ausbeuten der rekombinanten Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> ermöglichen. Tatsächlich wurde die Raum-Zeit-Ausbeute unter Verwendung des BL21-Extraktes um 36,5 % auf 283,7 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> gesteigert. Erneut zeigten die HPLC-Analysen des diskontinuierlich beprobten Assays ein Ungleichgewicht in Bezug auf die detektierten Fruktose- und Glukose-Einheiten, was auf die geringe Auflösung und Trennleistung der verwendeten Trennsäule Aminex HPX-42A zurückzuführen war. Die nachgewiesener Fruktose-Äquivalente lagen mit 129,2 % erneut deutlich über den nachweisbaren Glukose-Einheiten (99,5). Grundsätzlich muss davon ausgegangen werden, dass die Produkte in dieser Versuchsreihe überquantifiziert wurden

Um die Stabilität der im Extrakt befindlichen rekombinanten Enzyme auszutesten und den Anteil der zugesetzten Extrakt-Menge zu reduzieren, wurde im Triplikat eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, für die reduzierte Volumina des zuvor beschriebenen Extraktes eingesetzt wurden (Kapitel Zwei Proteinbanden wurden mittels Silberfärbung (Abbildung 44B) und Western Blotting (Abbildung 44C) generiert, die den vorhergesagten Molekulargewichten der Endolevanase (58,7 kDa) und der Levansucrase (51,2 kDa) entsprachen.

3.6.3.2 Untersuchung des 1-Stamm-Systems zur Extrakt-basierten FOS-Produktion). In den untersuchten Reaktionen wurden bei der Zugabe von 5 µl Rohextrakt nach 55 stündiger Inkubation 90 % [w/w] der aus dem Substrat Saccharose freigesetzten Glukose- und Fruktose-Einheiten in den chromatographisch detektierten Reaktionsprodukten nachgewiesen. Die Ausbeute an FOS mit einem DP ≥ 3 belief sich nach Ablauf der Reaktion auf 372,6 ± 10,8 g L<sup>-1</sup>. Bei der Zugabe von 10 µl Rohextrakt verlief die Reaktion erwartungsgemäß schneller, sodass bereits nach 27 Stunden mehr als 90 % [w/w] des Substrates umgesetzt wurden. 97,7 % [w/w] der freigesetzten Glukose- und Fruktose-Einheiten ließen sich zu diesem Zeitpunkt in den Produkten wiederfinden. FOS mit einem DP ≥ 3 wurden zum Zeitpunkt der letzten Probennahme in einer Konzentration von 369 ± 12,6 g L<sup>-1</sup> nachgewiesen. Durch den vollständigen Ablauf der enzymatischen Reaktion bei deutlich reduzierten Extrakt-Volumina wurde die Stabilität der rekombinanten Enzyme in Extrakt-Form verifiziert. Die Enzyme zeigten für mehr als 50 Stunden Aktivität und das Abflachen der Saccharose-Umsetzung zum Ende der Reaktion lies sich eher mit dem hohen K<sub>M</sub>-Wert der beteiligten Levansucrase LevS1417 begründen, als mit einer zeitlich bedingten Inaktivierung der Enzyme. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Anteil an Extrakt-Volumen für die Extrakt-basierte Produktion Levan-basierter FOS noch weiter reduziert werden kann.

#### 4.3.3.1 Upscaling der Extrakt-basierte Produktion Levan-basierter FOS aus Saccharose

Um die Skalierbarkeit des entwickelten Systems zu testen, wurde die etablierte Extrakt-basierte FOS-Produktion auf einen 500 ml Maßstab ausgeweitet. Zwischen der Durchführung der zuvor beschriebenen

Extrakt-basierten Ansätze und der Upscale-Produktion konnte die chromatographische Analytik durch den Einsatz von Aminophasen-Trennsäulen deutlich verbessert werden. Diese Säulen ermöglichen die Identifizierung und Quantifizierung von FOS mit gleichem Polymerisierungsgrad aber variierendem Bindungstypen. Das im Duplikat durchgeführte Experiment bestätigte die Skalierbarkeit des entwickelten Verfahrens und untermauerte die Beobachtung, dass die Ausbeute an FOS bzw. polymerem Levan erheblich von der Menge an zugefügter Levansucrase abhängt. Nach der 48-stündigen Inkubation, in der die Saccharose-Konzentration von  $809,6 \pm 1,3$  auf  $127 \pm 0,7$  g L<sup>-1</sup> reduziert wurde, zeigte sich ein heterogenes Produktspektrum, welches FOS mit GF<sub>n</sub> und F<sub>n</sub>-Struktur beinhaltete. Das Auftreten von FOS mit F<sub>n</sub>-Charakter bestätigte die Funktionalität der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> im Extrakt-basierten System. In Übereinstimmung mit den Daten von Raga-Carbajal *et al.* (2016) zeigte sich, dass die Levansucrase LevS1417 1-Kestose und 6-Kestose als initiale Produkte der Levansucrase-vermittelten Transfruktosylierungsreaktion bildete. Diese Verbindungen wurden dann an Position 6 der terminalen Fruktose-Einheit durch weitere Fruktose-Einheiten elongiert, was zur Akkumulation von 1K-FOS und 6K-FOS führte. Am Ende der 48-stündigen Inkubation betrug die Ausbeute an FOS mit einem DP  $\geq 3$  und internen  $\beta$ -2,6-Fruktosylresten  $319,9 \pm 16,6$  g L<sup>-1</sup>. Das bi-enzymatische System lieferte überwiegend FOS mit GF<sub>n</sub>-Charakter, welche, wie kürzlich publizierte Daten zeigten, probiotische Bakterien besser in ihrem Wachstum fördern als FOS mit F<sub>n</sub>-Charakter (Wang *et al.* 2020).

Bisher wurde in der Literatur erst ein einziges Produktionsverfahren erwähnt, indem Levan-FOS durch den simultanen Einsatz einer Levansucrase und Endolevanase produziert wurden. Die Forscher um Jaime R. Porras-Dominguez fusionierten die Levansucrase SacB aus *B. subtilis* 168 mit der Endolevanase LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* IBt1 und produzierten mit dem Fusionsprotein ausgehend von Saccharose Levan-basierte FOS (Porras-Domínguez *et al.* 2017). Auf diese Weise wurde bei einem Volumen von 600 ml eine Levan-FOS Ausbeute von 210,4 g L<sup>-1</sup> und bei 1,7 L eine Levan-FOS Ausbeute von 208,4 g L<sup>-1</sup> erzielt. Wie in einer früheren Publikation aufgeklärt wurde, produziert die Endolevanase LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* IBt1 mit einer spezifischen Aktivität von 1,8 U mg<sup>-1</sup> FOS mit einem DP zwischen 2 – 8 (Porras-Domínguez *et al.* 2014). Bei verlängerter Inkubation bildet das Enzym größere Mengen des Disaccharids Levanbiose. Dieser Effekt machte sich auch bei der FOS-Synthese unter Verwendung des Fusionsproteins LevB<sub>1</sub>SacB bemerkbar, da dort Levanbiose mit einem Gehalt von 48,9 g L<sup>-1</sup> das primäre Reaktionsprodukt darstellte. Vor dem Hintergrund von Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates kann dieses Produkt nicht als präbiotischer Ballaststoff deklariert werden. Wie die HPAEC-PAD-Chromatogramme in der erwähnten Publikation zeigen, generierte das Fusionsprotein, ähnlich wie das in dieser Arbeit verwendete bi-enzymatische System, ein heterogenes FOS-Spektrum. Ein genauer Vergleich mit dem System von Porras-Dominguez *et al.* (2017) kann an dieser Stelle nicht vorgenommen werden, da die Autoren in ihrer Veröffentlichung keine Angaben darüber machten, wie viel Zeit das Fusionsprotein LevB<sub>1</sub>SacB für die Umsetzung der supplementierten Saccharose benötigte. Des Weiteren wird aus der Publikation nicht ersichtlich, welche Proteinausbeuten durch den verwendeten Produktionsstamm *E. coli* erzielt wurden. Aufgrund der

höheren spezifischen Aktivitäten der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> stellt das beschriebene Extrakt-basierte System eine vielversprechende Möglichkeit für die skalierbare Produktion Levan-basierter FOS dar. Um das präbiotische Potenzial des heterogenen FOS-Gemischs zu evaluieren, welches durch das bi-enzymatische Verfahren generiert wird, sollten nachfolgende Arbeiten untersuchen, inwiefern probiotische Bakterien durch das besagte FOS-Gemisch in ihrem Wachstum gefördert werden. In diesem Zusammenhang könnte sich die ausgiebige Methodenentwicklung für den chromatographischen Nachweis der FOS bezahlt machen, da die verwendeten Aminophasen-Trennsäulen Europsher II 100-5 NH<sub>2</sub> (Knauer GmbH; Berlin, Deutschland) und Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 3E (ShowaDenko K.K.; Tokio, Japan) auch im präparativen Maßstab verfügbar sind. Dies ermöglicht die Abtrennung der relevanten FOS von den Beiprodukten Glukose, Fruktose und Saccharose durch präparative HPLC und eine Verfütterung der gereinigten FOS an probiotische Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* sowie an repräsentative Vertreter der intestinalen Mikrobiota.

#### **4.3.4 Optimierung regulatorischer Plasmid-Elemente zur Steigerung rekombinanter Proteinausbeuten**

Um die Ausbeuten der rekombinanten Proteine LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> im Zuge der heterologen Produktion in *E. coli* zu steigern, erfolgte eine Optimierung regulatorischer Elemente der verwendeten pASK5-Überexpressionsplasmide. Primäres Ziel der Optimierung war dabei die Modifikation der Vektor-kodierten Ribosomenbindestelle. Grundsätzlich ist die bakterielle Translation durch vier Phasen definiert: Initiation, Elongation, Termination und das Ribosomen-Turnover (Laursen et al. 2005). Die Initiation der Translation, die häufig den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt während der Translation darstellt, wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Zu diesen Faktoren zählt die Hybridisierung der 16S rRNA an die RBS-Sequenz, die Bindung der tRNA<sup>fMET</sup> an das Start-Codon, die Distanz zwischen der 16S rRNA-Bindestelle und dem Start-Codon (Spacer-Region) sowie das Auftreten von RNA-Sekundärstrukturen, die die Bindestellen der 16S rRNA verdecken (de Smit & van Duin 1990; Vellanoweth & Rabinowitz 1992; Chen et al. 1994; Kudla et al. 2009). Im Zuge der Translationsinitiation bindet das 3'-Ende der 16S rRNA (in *E. coli*: 3'-AUUCCUCCA-5') an die RBS und vermittelt so die Bindung der mRNA an das Ribosom. Ein Abgleich der pASK-kodierten RBS deckte auf, dass diese nur bedingt zur Hybridisierung mit dem erwähnten 3'-Ende der *E. coli* 16S rRNA geeignet ist. Auf Basis der Publikation von Ringquist *et al.* (1992) wurde die pASK-RBS durch die Sequenz AGGAGG substituiert und die Spacer-Region angepasst. Die Modifikation der RBS- und Spacer-Sequenz steigerte die Ausbeuten der rekombinanten Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> deutlich (Kapitel 3.6.4). Im Fall des erstgenannten Enzyms wurde die Gesamt-Ausbeute um den Faktor 2,5 von 4,1 mg auf 10,1 mg pro L Kultur gesteigert. Für die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> war der Effekt noch größer. Dort wurde der Ertrag an rekombinantem Protein durch die Modifizierung der RBS um den Faktor 4 von 3,6 mg auf 14,3 mg pro L Kultur erhöht. Die Optimierung der RBS stellte sich somit als effektives Mittel für die Maximierung rekombinanter Proteinausbeuten unter Verwendung der pASK-IBA5-Vektoren dar. Um die Ausbeuten noch weiter zu steigern, sollte der Einsatz synthetischer RBS-

Sequenzen in Betracht gezogen werden. Der von Howard M. Salis entwickelte RBS-Calculator generiert auf Basis optimierter Algorithmen und kinetischer Modelle eine ideale Ribosomenbindestelle für kodierende Nukleotidsequenzen (Salis et al. 2009). Diese synthetische RBS soll eine maximale Translationsinitiationsrate gewährleisten.

#### **4.3.5 Integration des Gens *levS1417* in das Genom von *E. coli* BW25113**

Um den entwickelten Prozess zur Produktion Levan-basierter FOS weiter an industrielle Maßstäbe anzupassen, wurde eine Integration des Gens *levS1417* in das Genom von *E. coli* BW25113 vorgenommen. Das dafür verwendete System auf Basis von CRISPR-Cas9, das von Bassalo et al. (2016) entwickelt wurde, konnte effizient zur Integration der Levansucrase-kodierenden Nukleotidsequenz verwendet werden (Kapitel 3.6.5). 50 % der im Anschluss an das Integrationsprotokoll gescreeenten Transformanten zeigten eine Integration des gewünschten Fragmentes. Durch den Upstream des Gens *levS1417* gelegenen, konstitutiven T7A1-Promotors ermöglichte die Integrationsmutante eine Induktor-unabhängige Produktion der Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417. Ferner wurde für die Anzucht des Stammes kein Antibiotikum benötigt, dass die Aufrechterhaltung der zuvor verwendeten Plasmide gewährleistete. Im direkten Vergleich mit dem Extrakt von *E. coli* BL21 pASK5\_optRBS\_*levS1417* zeigte Zell-Extrakt auf Basis der Genomintegrate eine deutlich langsamere Umsetzung von zugefügter Saccharose. Dies lässt sich durch die geringe Kopienzahl des Gens *levS1417* begründen, die die genomische Integration ermöglicht. Die multiple Integration der Levansucrase-kodierenden Sequenz könnte jedoch ähnliche Produktionsraten wie die zuvor beschriebenen Plasmid-basierten Systeme erzielen. Solch eine Multi-Integration sollte sich aufgrund der hohen Flexibilität des verwendeten Integrationsverfahrens unproblematisch bewerkstelligen lassen. Für die Endolevanase LevB<sub>2286</sub> konnte keine Integrationsmutante generiert werden, da die Klonierung des für die Integration notwendigen Plasmids pSS9\_optRBS\_*levB2286* fehlschlug. Wie die Arbeit von Bassalo et al. (2016) zeigte, kann anstelle des pSS9-Plasmids auch ein lineares DNA-Fragment für die Durchführung des Integrationsprotokolls verwendet werden. In zukünftigen Arbeiten könnte somit durch synthetische DNA-Fragmente, die die kodierende Sequenz der Endolevanase LevB<sub>2286</sub> beinhalten, eine erfolgreiche Integration des Gens *levB2286* in das Genom von *E. coli* BW25113 durchgeführt werden. Grundsätzlich konnte die Effektivität der CRISPR-Cas9 basierten Genomintegration in dieser Arbeit verifiziert werden, sodass optimierte Stämme für industrielle Prozesse in zukünftigen Arbeiten generiert werden können.

#### **4.4 Präbiotika und Probiotika – Eine Übersicht**

Wie im einleitenden Teil dieser Arbeit erwähnt wurde, erweitert das noch recht junge, präbiotische Konzept das vor über 100 Jahren begründete, probiotische Konzept zu einem ganzheitlichen Ansatz, der auf die Verbesserung der menschlichen Gesundheit abzielt. Seine berühmte Aussage "The dependence of the intestinal microbes on the food makes it possible to adopt measures to modify the flora in our bodies and to replace the harmful microbes by useful microbes" ergänzte Elias Metchnikoff, der Pionier

der Probiotika, mit dem Satz “Notwithstanding this difficulty, however, a rational solution of the problem must be sought.” Mehr als 100 Jahre nach dieser Feststellung existieren die experimentellen Hürden nicht mehr, die Metchnikoff ansprach, sodass die humane Mikrobiota nun aktiv durch präbiotische Substanzen moduliert werden kann. Große Bemühungen werden angestellt, um die Wechselwirkung zwischen Probiotika und Präbiotika zu nutzen, sei es von wissenschaftlicher Seite zur Ergründung physiologischer Prozesse und deren Auswirkungen auf den Menschen, oder von kommerzieller Seite, um das „beste“ Produkt am Markt zu platzieren. Die Internationale wissenschaftliche Vereinigung für Probiotika und Präbiotika (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, kurz: ISAPP) ist bemüht, strikte Definitionen für die Termini Präbiotika und Probiotika zu formulieren und neueste Erkenntnisse auf dem entsprechenden Forschungsgebiet in diese Definitionen einfließen zu lassen (Hill et al. 2014; Gibson et al. 2017). Um die Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, besser in den wissenschaftlichen Kontext einbinden zu können, soll der nachfolgende Teil dieser Dissertation einen Überblick über den aktuellen Wissensstand zum präbiotischen und probiotischen Effekt verschaffen.

#### 4.4.1 Probiotika

Im Jahr 2001 wurde durch ein Experten-Panel, bestehend aus Wissenschaftlern der „Food and Agricultural Organization“ (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO), eine allgemeingültige Definition für den Begriff Probiotika festgelegt. Demnach werden Probiotika definiert als „live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host“. Diese Definition wurde im Jahr 2013 durch die ISAPP geringfügig modifiziert zu einer grammatikalisch korrekteren Version. Gemäß der ISAPP handelt es sich bei Probiotika um „live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host“ (Hill et al. 2014). Die Autoren des ISAPP-Consensus Dokuments führten weiter aus, dass folgende Stämme als probiotische Kerngruppe angesehen werden, wenn sie in Lebensmitteln in einer Menge von  $1 \times 10^9$  KBE pro Portion verabreicht werden: *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* und *longum*) und *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* und *salivarius*). Zahlreiche Mikroorganismen werden täglich über die Nahrung aufgenommen, aber für nur wenige konnte ein valider Nachweis erbracht werden, dass sie einen gesundheitlichen Nutzen vermitteln. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen einem Probiotikum und einem potenziell gesundheitsfördernden Effekt nachzuweisen, müssen zahlreiche Kriterien erfüllt sein. Zu diesen Kriterien zählen: Temporale Korrelation; Stärke der Korrelation; Dosis-Abhängigkeit; Reproduzierbarkeit; biologische Plausibilität; Berücksichtigung alternativer Erklärungsansätze; Spezifität der untersuchten Zusammenhänge; und Übereinstimmung mit anderen Erkenntnissen (Schünemann et al. 2011). Ein Beweis entsprechender Kausalitäten sollte durch randomisierte, kontrollierte Studien (RCTs) erbracht werden, die vorzugsweise durch einen entsprechenden Review-Prozess oder Meta-Analysen bewertet wurden. Die Gesundheitseffekte, die durch Probiotika vermittelt



werden, konnten inzwischen zum Teil durch besagte RCTs aufgedeckt werden (Alfaleh & Anabrees 2014; Hao et al. 2015; Goldenberg et al. 2017).

Grundsätzlich besteht eine Tri-direktionale Verbindung zwischen einem Probiotikum, der humanen Mikrobiota und dem menschlichen Wirt (Abbildung 57). Einige der in Abbildung 57 dargestellten Effekte sind innerhalb einiger taxonomischer Gruppen weitverbreitet, wie die Hemmung potenzieller Pathogene und die Produktion nützlicher Stoffwechsellendprodukte und Enzyme (Reid et al. 2011; Kumar et al. 2013). Weitere Mechanismen, die von der probiotischen Kerngruppe moduliert werden, sind die Normalisierung einer gestörten Mikrobiota, ein erhöhter Umsatz von Enterozyten und die Regulierung der Darmtätigkeit (Hill et al. 2014).

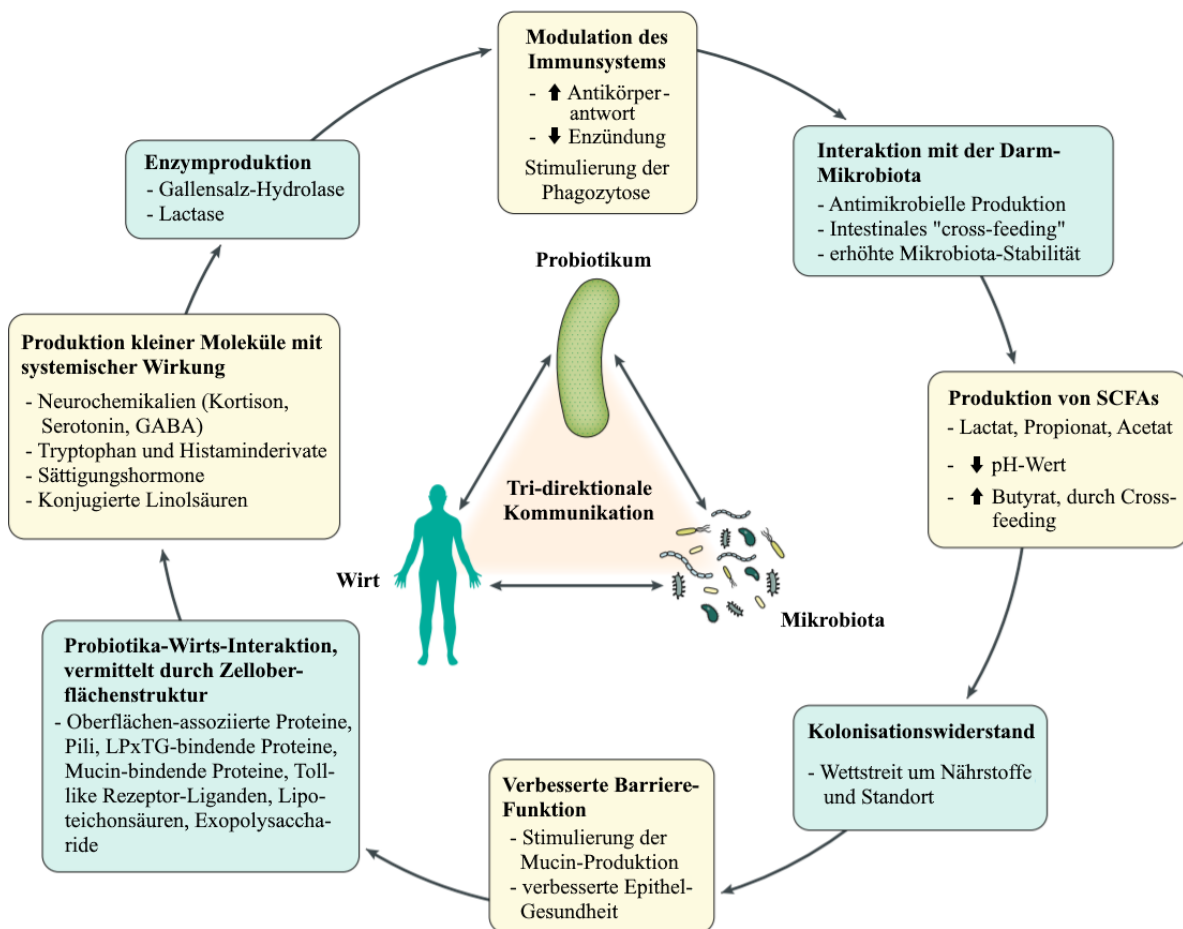


Abbildung 57: Visualisierung des probiotischen Wirkmechanismus. Die gesundheitsfördernden Effekte von Probiotika werden durch die Interaktion mit anderen Mikroorganismen der humane Mikrobiota oder durch direkte Interaktion mit den Wirtszellen ausgelöst. Entnommen aus Sanders *et al.* (2019); modifiziert.

Effekte, wie die Vitaminsynthese, die Verstärkung der Darm-Barriere, die Neutralisierung von Karzinogenen und die Modulation des Gallensalz-Metabolismus sind Gattungsspezifisch und weniger weit verbreitet als die zuvor erwähnten Mechanismen. Seltene Effekte, die Stammspezifisch vermittelt werden, können zusätzlich neurologische, immunologische und endokrinologische Funktionen modulieren (Heuvelin et al. 2009; Fernandez et al. 2011). Aufgrund der tri-direktionalen Interaktion, die

in Abbildung 57 veranschaulicht wird, bedarf es eines experimentellen Nachweises auf der Ebene des Wirtes Mensch, um eine valide Aussage über die Wirksamkeit eines Probiotikums zu treffen.

#### 4.4.1.1 Kurzkettige Fettsäuren – Mediatoren des probiotischen Effekts

Moderne Metagenom-Analysen konnten zur Identifikation spezifischer Darm-Enterotypen beitragen und deckten auf, dass eine geringe mikrobielle Diversität mit verschiedenen Darm-Erkrankungen korreliert, wie beispielsweise chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (englische Abkürzung: IBD), metabolischen Störungen und dem Reizdarmsyndrom (Qin et al. 2010; Lepage et al. 2011; Jeffery et al. 2012; Manichanh et al. 2012). Obwohl die Kausalität dieses Zusammenhangs noch nicht verifiziert werden konnte, ist bekannt, dass eine frühe Antibiotika-Exposition das Risiko erhöht, IBDs oder Fettleibigkeit auszubilden (Hviid et al. 2011; Trasande et al. 2013). Die Metagenom-Analysen trugen ebenfalls dazu bei, neue Gattungen und Arten zu identifizieren, die mit einer robusten Darm-Mikrobiota assoziiert sind. Bei diesen potenziellen probiotischen Kandidaten handelt es sich um *Akkermansia muciniphila* (Zhai et al. 2019), *Faecalibacterium prausnitzii* (Miquel et al. 2013) und Butyrat-Produzenten wie *Roseburia* spp. (Tamanai-Shacoori et al. 2017) und *Eubacterium* spp. (Almeida et al. 2020). Butyrat sowie die kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) Acetat und Propionat sind Stoffwechselprodukte der humanen Mikrobiota und haben vielfältige Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel von Säugetieren. Sie werden daher als Mediatoren des probiotischen Effektes angesehen. Acetat (C2-Körper), Propionat (C3-Körper) und Butyrat (C4-Körper) sind im Kolon und im Stuhl in einem molaren Verhältnis von 60:20:20 nachweisbar (Cummings et al. 1987; Hijova & Chmelarova 2007; Binder 2009). An dieser Stelle der Hinweis, dass fäkale SCFA-Konzentrationen nicht die Produktionsraten der SCFAs in den Eingeweiden reflektieren, da diese kontinuierlich durch den Wirt und andere Mitglieder der Mikrobiota aufgenommen und verstoffwechselt werden. Der Wirkort und der Wirkmechanismus der einzelnen SCFAs variiert erheblich. So erreicht Acetat die Pfortader, die das Blut aus den unpaaren Bauchorganen (Magen, Dünndarm, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse und Milz) zur Leber führt, und wird in verschiedenen Geweben metabolisiert. Acetat wird geringfügig durch die Darmepithelzellen verstoffwechselt und führt grundsätzlich zu einer Verringerung des pH-Wertes in entsprechenden intestinalen Kompartimenten. Diese pH-Reduktion, die auch durch Propionat und Butyrat ausgelöst wird, inhibiert pH-sensitive pathogene Bakterien wie Enterobacteriaceae und Clostridien in ihrem Wachstum (Prohászka et al. 1990; Cherrington et al. 1991; Duncan et al. 2009). Ferner besitzt Acetat anti-inflammatorische Eigenschaften und trägt im Zuge des intestinalen „Cross-Feedings“ zur Erhöhung der Butyrat-Konzentration im Darm bei (Belenguer et al. 2006). Dadurch, dass Acetat in den Blutkreislauf eintritt, sind die systemischen Auswirkungen vielfältig und häufig mit anderen Organen assoziiert. So dient es in der Leber als Substrat für die Cholesterin- und die Fettsäure-Synthese, während es im Gehirn- und Muskelgewebe als Energiequelle fungiert (Rivière et al. 2016). Propionat erreicht ebenfalls die Pfortader und wird daher, ähnlich wie Acetat, durch die Leber aufgenommen. Zusätzlich kann auch Propionat geringfügig durch Darmepithelzellen verstoffwechselt werden und inhibiert die Proliferation von kolorektalen Krebszellen, indem es deren Apoptose induziert.

Weitere Effekte, die durch den C3-Körper moduliert werden, sind anti-inflammatorische Reaktionen, eine Verringerung des Blut-Cholesterin-Levels, eine Reduktion der Leber-Lipogenese und einer erhöhte Insulin-Sensitivität (Rivière et al. 2016). Im Gegensatz zu Acetat und Propionat erreicht Butyrat nur in geringen Mengen die Pfortader, da es durch Darmepithelzellen aufgenommen wird und deren primäre Energiequelle darstellt. Butyrat stimuliert die Proliferation von Darmepithelzellen, verhindert gleichzeitig die Proliferation kolorektaler Krebszellen und verbessert die Barriere-Funktion des Darms, indem es die Produktion von Mucin, antimikrobiellen Peptiden und Tight-Junction Proteinen stimuliert. Weitere Funktionen, die Butyrat moduliert, sind anti-inflammatorische Kaskaden, eine Stimulierung der Wasser- und Natriumabsorption sowie eine Verringerung des oxidativen Stresses im Darm.

Die Wissenschaftler um Eef Boets untersuchten in einer aktuellen Studie die systemische Verfügbarkeit und die Metabolisierung von kurzkettigen Fettsäuren im menschlichen Darm (Boets et al. 2017). Dafür verabreichten sie zwölf gesunden Testpersonen  $^{13}\text{C}$ -markiertes Acetat, Propionat und Butyrat und detektierten die Plasma-Konzentration von  $^{13}\text{C}$ -SCFAs,  $^{13}\text{C}$ -Glukose,  $^{13}\text{C}$ -Cholesterin und  $^{13}\text{C}$ -Fettsäuren. Die Forscher ermittelten eine systemische Verfügbarkeit von Acetat, Propionat und Butyrat von 36 %, 9 % und 2 %, was bestätigt, dass Acetat und Propionat im Gegensatz zu Butyrat vermehrt in den systemischen Blutkreislauf eintreten. Ferner deckten die Forscher auf, dass ein relevanter Anteil des verabreichten Acetats (24 %) durch die Mikrobiota der Probanden in Butyrat umgewandelt wurde. Dieses Resultat unterstreicht die Relevanz des intestinalen Cross-Feedings, bei dem Mikroorganismen wie *Roseburia* spp., *Eubacterium* spp. und *F. prausnitzii* mikrobiell produziert Acetat zu Butyrat umsetzen. In diesem Zusammenhang wird die Komplexität des humanen Mikrobioms deutlich, in welchem sich zahlreiche Organismen gegenseitig in ihrem Wachstum und/oder ihrer Aktivität beeinflussen. In Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchten Präbiotika bedarf es daher valider Nachweismethoden, um die Komplexität des Habitats Darm realistisch nachzubilden und die Auswirkung präbiotischer Substanzen zu evaluieren. So zeigten mehrere Studien, dass zahlreiche Vertreter der Mikrobiota nicht in der Lage sind komplexe Polysaccharide, die primäre Nahrungsquelle im Darm, zu verstoffwechseln, jedoch immens durch das intestinale Cross-Feeding begünstigt werden (Zeybek et al. 2020). Begünstigend können dabei die angesprochenen SCFAs wirken aber auch Produkte, die im Zuge der enzymatischen Hydrolyse von Zuckerpolymeren entstehen. So wurde für einige Arten der Gattung *Bifidobacterium* gezeigt, dass diese nicht in der Lage sind, polymeres Inulin abzubauen. Durch intestinales Cross-Feeding werden Bifidobakterien jedoch auch durch polymeres Inulin begünstigt, da sie die Mono-, Di- und Oligosaccharide verstoffwechseln, die von primären Inulin-Verwertern freigesetzt werden (Rossi et al. 2005; Salazar et al. 2009).

Neben den beschriebenen Gattungen werden auch Mitglieder der Ordnung Bacteroidales als Probiotika der zweiten Generation erforscht, was auf die hohe Abundanz dieser Familie im menschlichen Darm zurückzuführen ist. So konnten Deng *et al.* (2016) den Stamm *Bacteroides fragilis* ZY-312 aus dem Stuhl eines gesunden, gestillten Säuglings isolieren und nachweisen, dass der Organismus die Produktion mikrobizider Moleküle und die phagozytäre Funktion von Makrophagen positiv moduliert.

Diese Funktionen scheinen jedoch Stamm-spezifisch zu sein, da berichtet wurde, dass *B. fragilis* Fragilysin bildet (Obiso et al. 1997; Moncrief et al. 1998), das als Risikofaktor für die Entwicklung von Darmkrebs angesehen wird (Shiryaev et al. 2013) und kein wünschenswertes Merkmal eines Next-Generation-Probiotikums (NPGs) ist. Auch *B. xylanisolvens* DSM 23964 wird als potenzielles NPG angesehen, da dieser Organismus im Gegensatz zu *B. fragilis* kein Fragilysin bildet. Es konnte gezeigt werden, dass Hitze-inaktivierte Zellen von *B. xylanisolvens* das Level der Thomsen-Friedenreich-spezifischen Immunglobulin M (IgM) Antikörper (TF $\alpha$ ) dosisabhängig steigern (Ulsemer et al. 2016). Durch die Hitze-Inaktivierung geht jedoch eine der grundlegendsten Bedingungen für eine probiotische Klassifizierung verloren, nämlich die Tatsache, dass entsprechende Präparate lebende Mikroorganismen enthalten müssen (Hill et al. 2014). Weitere Vertreter der Bacteroidales wie beispielsweise *B. dorei* D8, *B. acidifaciens* und *B. ovatus* sind in den vergangenen Jahren ebenfalls in den Fokus der probiotischen Forschung gerückt. Der Evidenzgrad für positive probiotische Effekte, die durch diese Organismen vermittelt werden, ist jedoch eher gering und bedarf weiterer Forschung (O'Toole et al. 2017).

#### 4.4.1.3 Darm-Hirn-Achse

Das noch recht junge Forschungsgebiet der Neurogastroenterologie beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Darmzusammensetzung und psychisch assoziierten Erkrankungen. Studien konnten aufdecken, dass eine Störung der Darm-Mikrobiota signifikant zur Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen beiträgt (Foster & McVey Neufeld 2013; Fung et al. 2017; Kowalski & Mulak 2019). Die Forscher um Thomas C. Fung analysierten dafür an Mäusen die Auswirkung der Mikrobiota auf die Physiologie und Funktionalität von Mikroglia-Zellen, die am häufigsten vorkommenden residenten Immunzellen im Gehirn. Mikroglia, die etwa 20 % aller Glia-Zellen ausmachen, sind an der Phagozytose, der Antigen-Präsentation, der Zytokin-Produktion und der Aktivierung von Entzündungsreaktionen beteiligt (Nayak et al. 2012; Nayak et al. 2014). Keim-freie (KF) – Mäuse und Mäuse, deren Mikrobiota durch Antibiotika-Gabe zerstört wurde, zeigten im Vergleich mit normalen Mäusen eine erhöhte Zahl an unreifen Mikroglia-Zellen in verschiedenen Hirn-Arealen (Erny et al. 2015). Diese Unreife äußerte sich durch funktionelle und physiologische Beeinträchtigungen. KF-Mäuse, die mit einer Minimal-Mikrobiota, bestehend aus *Bacteroides distasonis*, *Lactobacillus salivarius* und ASF 356 (ein Isolat, das dem *Clostridium* Cluster XIV angehört) kolonisiert wurden, behielten die Mikroglia-Anomalien bei. KF-Mäuse, die postnatal mit SCFAs supplementiert wurden, zeigten hingegen eine Normalisierung der KF-assoziierten Veränderung der mikroglialen Morphologie, Abundanz und Genexpression (Erny et al. 2015). Einen detaillierten Mechanismus für die SCFA-vermittelte Normalisierung der Mikroglia konnten die Wissenschaftler nicht formulieren, da die systemischen Funktionen, die durch SCFAs moduliert werden, zu vielfältig sind. Eine Einordnung, ob die Glia-Zellen aktiv durch die Fettsäuren moduliert werden oder die Morphologie der Glia-Zellen indirekt durch die systemischen Funktionen reguliert wird, die SCFAs beeinflussen, steht daher noch aus. Grundsätzlich zeigten die Wissenschaftler aber eine Korrelation zwischen der Vitalität und Zusammensetzung der Mikrobiota und der Ausbildung von Mikroglia, die mit neurologischen

Krankheiten wie Autismus, Parkinson, Multipler Sklerose, Angststörungen, Depressionen, Schlaganfällen und Amyotropher Lateralsklerose assoziiert sind (Fung et al. 2017).

Neben dem Einfluss der Mikrobiota auf die Morphologie von Hirnstrukturen wurde in der Literatur auch der psychotrope Effekt von Probiotika untersucht. In einer Doppelblind-, Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie analysierten Messaoudi *et al.* (2011) den Effekt einer probiotischen Mischung auf die Stimmung und die psychische Belastung von Mäusen und Menschen. Die probiotische Mischung, die die Forscher für ihre Studie verwendeten, bestand aus den beiden Stämmen *Lactobacillus helveticus* R0052 und *Bifidobacterium longum* R0175. Nach täglicher, subchronischer Verabreichung konnten die Wissenschaftler durch standardisierte Tests nachweisen, dass die probiotische Mischung signifikant ( $P < 0,05$ ) ängstliches Verhalten bei Mäusen und psychisches Leiden bei Menschen linderte (Messaoudi et al. 2011). Diese Studie reihte sich somit ein in eine wachsende Zahl von Publikationen, die einen positiven Nachweis dafür erbringen konnten, dass psychische Erkrankungen mit Hilfe von Probiotika behandelt werden können (Dinan et al. 2013; Mohammadi et al. 2016; Fung et al. 2017). Aufbauend auf der zunehmenden experimentellen Evidenz etablierte sich in der Literatur der Begriff „Psychobiotics“, die definiert sind als „live organism that, when ingested in adequate amounts, produces a health benefit in patients suffering from psychiatric illness“.

#### 4.4.1.4 Die Magen-Passage – Der große Filter des probiotischen Konzeptes

Oral verabreichte Probiotika sind auf ihrem Weg zum Wirkort Darm sehr harschen Bedingungen ausgesetzt. Bedingt durch die hohen Säure- und Gallensalzkonzentrationen im oberen Verdauungstrakt (OV), wird die Vitalität von probiotischen Präparaten häufig extrem reduziert, wie durch mehrere Studien gezeigt wurde (Charteris et al. 1998; Fredua-Agyeman & Gaisford 2015). Um den gastrointestinalen Transit von probiotischen Mikroorganismen zu untersuchen, kreierten die Wissenschaftler um W. P. Charteris eine künstliche Magensäure und setzten insgesamt 15 probiotische Stämme dieser Magensäure aus (Charteris et al. 1998). 14 der 15 untersuchten Stämme (7 *Lactobacillus* Stämme & 8 *Bifidobacterium* Stämme) büßten in der simulierten Magenpassage > 90 % ihrer Vitalität ein. Lediglich ein *Lactobacillus* Stamm, *Lactobacillus fermentum* KLD, zeigte eine intrinsische Resistenz gegenüber den harschen Bedingungen des künstlichen Magensaftes. Die Forscher untersuchten zusätzlich den protektiven Einfluss von Milchproteinen und Mucin während der Magenpassage und postulierten, dass beide Substanzen als Puffer fungieren und die Aktivität von Verdauungsproteasen inhibiert. Der Effekt protektiver Verbindungen war jedoch äußerst stammspezifisch und variierte je nach Organismus stark.

Eine Studie aus dem Jahr 2014 untermauerte diese Erkenntnisse und konnte unter Verwendung von insgesamt acht kommerziell erhältlichen Probiotika aufdecken, dass die Zellzahl oral verabreichter Präparate in der Magen-Passage immens verringert wird. Die Ergebnisse der Forscher deuteten darauf hin, dass im Magen der Anteil vitaler Mikroorganismen derart reduziert wird, dass deren Überleben im

nachfolgenden Verdauungskompartiment, dem Dünndarm, nicht mehr gewährleistet ist und somit die Funktionalität des Präparates stark beeinträchtigt wird (Fredua-Agyeman & Gaisford 2015).

Um die Resistenz von probiotischen Stämmen gegenüber den harschen Bedingungen des oberen Verdauungstraktes zu erhöhen, werden diese häufig mittels Mikroverkapselung modifiziert (Sangeetha et al. 2005; Cook et al. 2012). In diesem Zusammenhang konnten sich vor allem Alginat und Pektin etablieren, da diese eine hohe Stabilität gegenüber einem sauren pH-Milieu und den Enzymen des OVs aufweisen und natürlicherweise durch Vertreter der humanen Darm-Mikrobiota abgebaut werden. Probiotika, die beispielsweise in Alginat-Chitosan Kapseln verabreicht werden, kommen in deutlich höheren Zellzahlen in den Ziel-Kompartimenten Dün- und Dickdarm an (Cook et al. 2012). Gegenwärtig enthält jedoch die Mehrheit der im Zusammenhang mit verkapselten Probiotika veröffentlichten Daten nur begrenzt Informationen über die Art der Freisetzung. Da die Wirkweise probiotischer Mikroorganismen jedoch stark vom entsprechenden intestinalen Kompartiment abhängt, bedarf es weiterer Studien, um die Freisetzung verkapselter Probiotika gezielt steuern zu können. In diesem Zusammenhang könnte auch das in dieser Arbeit untersuchte  $\beta$ -2,6-glykosidische Fruktanpolymer Levan an Interesse gewinnen. Dieses konnte erfolgreich für mehrere Drug-Delivery-Systeme verwendet werden, beispielsweise für die Verkapselung von Vancomycin (Sezer et al. 2017), BSA (Xu et al. 2020) und den Farbstoff Indocyanin Grün (Kim et al. 2015). Obwohl noch keine Studien zur Levan-assoziierten Verkapselung von Mikroorganismen existieren, erscheint eine solche Applikation aufgrund der zahlreichen Publikationen zu Levan-basierten Nanostrukturen nicht unwahrscheinlich (de Siqueira et al. 2020).

#### 4.4.2 Präbiotika

Neben den Probiotika bilden die Präbiotika den zweiten, fundamentale Pfeiler des gesamtheitlichen Konzepts zur aktiven Modulation der humanen Mikrobiota. In ihrem aktuellen Konsensus Dokument aus dem Jahr 2017 definierte die ISAPP Präbiotika als „a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit“ (Gibson et al. 2017). Das Merkmal der selektiven Fermentation ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig, da die humane Mikrobiota zwar von einer Vielzahl von Verbindungen beeinflusst wird (Abbildung 1), jedoch nur wenige dieser Verbindungen selektiv gutartige Bakterien begünstigen. Wie im einleitenden Teil dieser Arbeit erwähnt wurde, konnten bis dato lediglich vier Stoffklassen die für die präbiotische Klassifizierung notwendigen Kriterien erfüllen: Galaktooligosaccharide (GOS), Fruktooligosaccharide (FOS), Inulin und Lactulose (Scott et al. 2020). Diese Verbindungen fördern nachweislich gesundheitsfördernde Mikroorganismen der menschlichen Mikrobiota und sind resistent gegen den gastrischen pH, die Hydrolyse durch Säuger-Proteasen und gastrointestinale Adsorption. Aufgrund der hohen Komplexität der humanen Mikrobiota und des beschriebenen intestinalen Cross-Feedings, verlangt die wissenschaftliche Gemeinschaft höchste Standards für den experimentellen Nachweis der selektiven Fermentation. Zurzeit werden ausnahmslos randomisierte, Placebo-kontrollierte Blindstudien am Menschen oder an Tieren

berücksichtigt, um eine Kausalität zwischen einem potenziellen Präbiotikum und positiven Veränderungen spezifischer Gesundheits-Marker nachzuweisen. Zu diesen Markern zählen unter anderem Vorteile für den Gastrointestinal-Trakt (z. B. die Inhibierung von Pathogenen, Immunstimulation, Produktion von SCFAs), für den Kardiometabolismus (z. B. die Reduktion des Blut-Lipid-Levels, positive Effekte auf die Insulin-Sensitivität) und für die mentale Gesundheit (z. B. die Produktion von Metaboliten, die die Hirnfunktion, die Stimmung und die Kognition begünstigen). In den letzten Jahren entstand ein konstruktiver Diskurs darüber, ob Probiotika oder Präbiotika das Mittel der Wahl zur Modulation der humanen Mikrobiota sind. Grundsätzlich ist bekannt, dass die intestinale Mikrobiota abhängig von geographischen Faktoren starke Variationen aufweisen kann. Es wird daher spekuliert, dass die Begünstigung endogener Probiotika zuverlässigere Resultate vermitteln könnte als das Einbringen exogener Mikroorganismen in den Darm (Gibson et al. 2004). Zudem sind viele probiotischen Stämme nicht in der Lage, die harschen Bedingungen des oberen Verdauungstraktes in ausreichender Zahl und/oder Vitalität zu überstehen (Charteris et al. 1998; Fredua-Agyeman & Gaisford 2015). Aufgrund ihrer chemischen Stabilität erreichen oral verabreichte Präbiotika den Wirkort Darm in hoher Konzentration und können dort selektiv endogene Mikroorganismen fördern.

#### 4.4.2.1 Präbiotische Targets

Wie zuvor ausgeführt wurde, beinhalten die meisten probiotischen Präparate Vertreter der Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus*, da diese Organismen nachweislich das intestinale Cross-Feeding begünstigen und positive Gesundheitseffekte vermitteln. Entsprechend könnte man annehmen, dass Präbiotika das Wachstum human-assoziiierter Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* begünstigen. Tatsächlich konnten moderne Metagenom-Analysen aufdecken, dass diese beiden Gattungen zwar in der frühen Lebensphase den Darm von Säuglingen dominieren, sich deren Abundanz mit zunehmendem Alter jedoch drastisch verringert (Arboleya et al. 2016). In der frühen Kindheit wird der menschliche Darm von den Phyla Actinobacteria, Proteobacteria und Firmicutes dominiert, wobei die Gattung *Bifidobacterium* zwischen 60 und 70 % der intestinalen Biomasse ausmacht. Mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl dieser Gattung, jedoch bleibt sie mit einer relativen Abundanz von 2 – 14 % eine stabile Gattung im menschlichem Darm (Odamaki et al. 2016). Während die Zahl der Proteobakterien und Actinobakterien mit steigendem Alter sinkt, setzen sich die Phyla Firmicutes und Bacteroidetes als prädominante Vertreter der intestinalen Mikrobiota durch (The Human Microbiome Project Consortium 2012). Auch die intestinale Zahl der Gattung *Lactobacillus* nimmt mit fortschreitendem Alter ab, wodurch diese lediglich 0,2 – 1 % der Mikrobiota im Darm bzw. Stuhl repräsentieren (Mueller et al. 2006). Neueste Studien konnten jedoch aufdecken, dass Vertreter der Gattung *Lactobacillus* möglicherweise bevorzugt den Dünndarm kolonisieren und dort immunmodulatorische Funktionen vermitteln (Kleerebezem & Vaughan 2009). Untersuchungen, in denen die mikrobielle Zusammensetzung des Ileums analysiert wurde, konnten in einigen der untersuchten Ileostomie-Patienten eine relative Abundanz der Gattung *Lactobacillus* von 50 % nachweisen (Booijink et al. 2010).

Trotz der vergleichsweise geringen relativen Abundanz der Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* im menschlichen Darm, werden diese Organismen dennoch als primäre Targets des präbiotischen Effektes angesehen. Diese Annahme basiert auf den nachgewiesenen gesundheitsfördernden Effekten, die durch Vertreter dieser Gattungen vermittelt werden, und der experimentellen Evidenz, dass die orale Aufnahme präbiotischer Substanzen in einer Proliferation der genannten Bakterien im Darm resultiert. Die Forscher um Evelyne M. Dewulf untersuchten dafür in einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie den Effekt Inulin-basierter Fruktane auf die intestinale Mikrobiota übergewichtiger Frauen (Dewulf et al. 2013). Die Wissenschaftler deckten auf, dass das verabreichte Präbiotikum einen signifikanten Anstieg der Phyla Firmicutes und Actinobacteria induzierte, während die relative Abundanz des Phylums Bacteroidetes signifikant sank. Auf Gattungsebene wurde eine signifikante Zunahme von *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. und *Faecalibacterium prausnitzii* und eine signifikante Abnahme von *Bacteroides intestinalis* und *Bacteroides vulgatus* beobachtet. Aufgrund ähnlicher Ergebnisse festigte sich in der Literatur die Annahme, dass Bacteroidetes positiv mit Fett-reicher Nahrung und negativ mit Ballaststoff-reicher Nahrung korrelieren, während sich für Mitglieder der Firmicutes eine umgekehrte Korrelation zeigt (Wu et al. 2011). In einer weiteren Studie, die den strikten Richtlinien zur Validierung des präbiotischen Effektes entsprach, wurde unter Verwendung von Inulin ebenfalls ein signifikanter Anstieg des intestinalen Bifidobakterien-Gehaltes nachgewiesen (Vandeputte et al. 2017). Neben der Gattung *Bifidobacterium* spp. wurde die Gattung *Anaerostipes* spp. ebenfalls durch Inulin begünstigt, während die Abundanz der Gattung *Bilophila* spp. signifikant reduziert wurde. Keine signifikanten Shifts für die Gattungen *Akkermansia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* und *Lactobacillus* wurden in dieser Studie detektiert. Eine detaillierte Übersicht über humane Studien zur präbiotischen Wirkung von Inulin, Fruktooligosacchariden, Galaktooligosacchariden und Lactulose findet sich in der Publikation von M. Roberfroid, dem Begründer des präbiotischen Konzepts, in der die Resultate von 19 Studien zusammengetragen und interpretiert wurden (Roberfroid et al. 2010). In nahezu allen Referenzen, die in der genannten Publikation aufgeführt wurden, zeigte sich eine präbiotisch induzierte Zunahme von Vertretern der Gattungen *Bifidobacterium* und/oder *Lactobacillus*.

#### 4.4.2.2 Die präbiotische Wirksamkeit von Levan und Levan-FOS

Neben präbiotischen Fruktanen auf Inulin-Basis konnte dem  $\beta$ -2,6-glykosidisch verknüpften Levan und den darauf basierenden Levan-FOS ebenfalls ein präbiotischer Effekt nachgewiesen werden (Marx et al. 2000; Porras-Domínguez et al. 2014; Adamberg et al. 2015). Aufgrund der fehlenden kommerziellen Verfügbarkeit von Levan, ist die Datenlage in diesem Zusammenhang jedoch entsprechend dünn, weshalb großes Interesse besteht, effiziente Produktionsstrategien für das Polymer zu entwickeln. Trotz der limitierten Verfügbarkeit konnten mehrere Studien zeigen, dass Levan und Levan-FOS einen bifidogenen Effekt ausüben. Eine der aktuellsten Studien in diesem Zusammenhang ist die Publikation der Forscher um Chenxi Liu, in der verschiedene Kompartimente des Dickdarms (proximal, transversal und distal) durch kontinuierliche Fermentationssysteme simuliert und der präbiotische Effekt von Levan



und Inulin analysiert wurde (Liu et al. 2020). Mittels FISH (Fluoreszierende *in situ* Hybridisierung) wurde der bakterielle Gehalt von insgesamt neun bakteriellen Gruppen untersucht und es zeigte sich, dass Levan das Wachstum von Bifidobakterien und Mitgliedern der *Eubacterium rectale* – *Clostridium coccooides* Gruppe in allen simulierten Darmbereichen signifikant stimulierte, was in einem signifikanten Anstieg der SCFAs Acetat und Butyrat resultierte. Der bifidogene Effekt, der durch Levan vermittelt wurde ( $0,8 - 1,24 \log \text{ Zellen ml}^{-1}$ ), war dabei signifikant größer als unter Verwendung von Inulin ( $0,62 - 0,7 \log \text{ Zellen ml}^{-1}$ ). Die Autoren postulierten, dass die Ergebnisse mit den Beobachtung von Ávila-Fernández und Kollegen übereinstimmen, die aufdeckten, dass die  $\beta$ -Fruktofuranosidase von *B. longum* subsp. *infantis* ATCC eine höhere Affinität zu Levan-FOS als zu Inulin-FOS aufweist (Ávila-Fernández et al. 2016). Diese Aussage sollte jedoch durch weitere Untersuchungen zu  $\beta$ -Fruktofuranosidasen aus *Bifidobacterium* Arten, die im adulten Darm vorkommen, untermauert werden. Neben Bifidobakterien und der *Eubacterium rectale* – *Clostridium coccooides* Gruppe wurde durch die Levan-Zugabe in den simulierten Darm-Kompartimenten *Roseburia* spp. positiv und das Wachstum des clostridialen Clusters IX negativ begünstigt (Liu et al. 2020).

In einer weiteren Studie, in der fäkale Proben in einem mit Levan supplementierten Medium inkubiert wurden, zeigte sich ebenfalls ein präbiotischer Effekt für das Fruktanpolymer (Adamberg et al. 2015). Durch die komplexe Zusammensetzung des Inokulums begünstigte das zugefügte Levan sowohl Levan-hydrolysierende Taxa wie *Bacteroides*, *Streptococcus* und *Ruminococcus* als auch Butyrat-produzierende Taxa wie *Faecalibacterium* und *Erysipelotrichaeceae*. Diese Ergebnisse implizieren, dass Levan, ähnlich wie etablierte Präbiotika, das intestinale Cross-Feeding begünstigt und die Produktion von SCFAs im Darm fördert.

Der bifidogene Effekt von Levan-FOS konnte bisher lediglich in Reinkultur-basierten Ansätzen untersucht werden. Porras Dominguez *et al.* produzierten mit Hilfe der rekombinanten Endolevanase LevB<sub>1</sub> aus *B. licheniformis* IBT<sub>1</sub> Levan-basierte FOS und konnten mit diesen erfolgreich das Wachstum von vier ausgewählten Bifidobakterien (*B. bifidum*, 2x *B. longum* spp. *infantis*, *B. longum* und *B. breve*) und *Lactobacillus paracasei* selektiv fördern (Porras-Domínguez et al. 2014). In den Wachstumsversuchen zeigte sich zusätzlich ein bifidogener Effekt für polymeres Levan, da die untersuchten probiotischen Stämme auch durch das Polymer begünstigt wurden. Marx *et al.* produzierten Levan-FOS, indem sie polymeres Levan sauer hydrolysierten (Marx et al. 2000). Das Hydrolysat wurde von den Wissenschaftlern erfolgreich zur Kultivierung von *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* und *B. pseudocatenulatum* eingesetzt, was in einer verstärkten Acetat-Produktion resultierte. Die Ergebnisse von Porras-Dominguez *et al.* und Marx *et al.* widersprachen einigen Studien, in denen der bifidogene Effekt von Levan und Levan-Oligomeren untersucht wurde. Yamamoto *et al.* konnten zum Beispiel unter Verwendung von LMW-Levan (DP ~ 33) keinen bifidogenen Effekt beobachten (Yamamoto et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Studie, in der das Wachstum verschiedener Bifidobakterien auf Inulin und Levan analysiert wurde (McKellar et al. 1993). Marx *et al.* stellten in ihrer Publikation die Hypothese auf, dass der bifidogene Effekt von Inulin- und Levan-

Präparationen Spezies-abhängig ist und der Polymerisierungsgrad des supplementierten Fruktans den bifidogenen Effekt maßgeblich beeinflusst, sogar stärker als die Art der Verknüpfung (Marx et al. 2000). Diese Hypothese wurde durch die bereits erwähnte Studie von Wang *et al.* (2020) bestätigt, in der der experimentelle Nachweis erbracht wurde, dass kurzkettige FOS das Wachstum von Bifidobakterien stärker fördern als längerkettige FOS. Diese Ergebnisse bekräftigen die Relevanz des in dieser Arbeit entwickelten Systems zur Produktion präbiotischer FOS. Durch den Enzym-basierten Prozess (Abbildung 47) konnte in unter 50 h Inkubation eine FOS-Ausbeute von  $349,3 \pm 17,2 \text{ g L}^{-1}$  erzielt werden. Der Polymerisierungsgrad der Produkte lag dabei überwiegend zwischen 3 und 7, wodurch diese als präbiotische Ballaststoffe deklariert werden dürfen und aufgrund der kurzen Kettenlänge durch ein breites Spektrum an gutartigen Darmbakterien verstoffwechselt werden könnten. Aufgrund des heterogenen Produktspektrums von Levansucrasen und der präbiotischen Wirksamkeit Inulin-basierter FOS, sollte die Wirksamkeit heterogener Levan-FOS Gemische vermehrt in den Fokus der Forschung rücken. Das in dieser Arbeit beschriebene bi-enzymatische System umgeht dabei die Akkumulation von polymerem Levan und die damit einhergehende Viskositätssteigerung der Prozesslösung. Durch etablierte Verfahren wie Nanofiltration (Kuhn et al. 2010), Festbett-Säulen-Chromatographie (Kuhn & Filho 2010; Kuhn et al. 2014) oder die moderne SMB-Technologie (Nobre et al. 2010) können die Produkte des bi-enzymatischen Systems in größeren Mengen aufgereinigt werden. Durch *in-vivo* und *in-vitro* Experimente sollte zeitnah evaluiert werden, ob das besagte FOS Gemisch gutartige Vertreter der intestinalen Mikrobiota selektiv in ihrem Wachstum und/oder ihrer Aktivität fördert.

### 4.4.3 Synbiotika

Aufgrund der individuellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota gestalten sich allgemeingültige Therapie-Ansätze zur Modulation der mikrobiellen Darmzusammensetzung schwierig. Um die Vorteile probiotischer und präbiotischer Strategien zu vereinen und individuelle Therapeutika zu generieren, wurden sogenannte Synbiotika entwickelt, die sich aus einem Gemisch aus einem oder mehrerer Prä- und Probiotika zusammensetzen. (Schrezenmeir & De Vrese 2001; Kolida & Gibson 2011). Synbiotika lassen sich grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilen. Bei der ersten Gruppe, den komplementären Synbiotika, werden die verwendeten Prä- und Probiotika unabhängig voneinander ausgewählt. Im Fokus dieser Präparate stehen die individuellen Effekte, die von den synbiotischen Komponenten im Wirt ausgelöst werden (Krumbeck et al. 2016). Anders verhält es sich bei den synergistischen Synbiotika, bei denen ein präbiotisches Substrat gezielt die Kompetitivität, das Überleben oder die metabolische Aktivität eines probiotischen Partner-Stamms fördert. Diese Präparate würden auch in Probanden funktionieren, in denen die notwendigen Responder-Stämme für verabreichte Präbiotika fehlen. Das Auftreten solcher Non-Responder-Patienten ist eines der größten Defizite des präbiotischen Konzepts, da deren Funktionalität von der Präsenz bestimmter Gattungen im Darm abhängig ist (Reid et al. 2010). Mehrere Studien konnten die Effektivität von Synbiotika verifizieren (Ogawa et al. 2005; Ogawa et al. 2006; Krumbeck et al. 2015), jedoch existiert lediglich eine einzige Studie, in der die Effektivität von Synbiotika am Menschen untersucht wurde. (Tanaka et al. 1983). Der

Trend in der therapeutischen Modulation der humanen Mikrobiota geht in Richtung einer zunehmenden Individualisierung der präbiotischen und probiotischen Zusammensetzung. Dafür werden in Patienten durch Präbiotika-Gabe endogene Probiotika angereichert, diese identifiziert und isoliert. Ein synbiotisches Präparat bestehend aus solch einem angereicherten, endogenen Probiotikum und dem für die Anreicherung genutzten Präbiotikum (GOS), führte in Ratten dazu, dass *B. adolescentis* eine relative Abundanz von 30 % im Darm erreichte (Krumbeck et al. 2015). Inwiefern solch eine individualisierte Methode auf eine breite Bevölkerungsgruppe angewendet werden kann, bleibt fraglich, da die Kosten für solch eine synbiotische Behandlung deutlich über den Kosten kommerziell verfügbarer Pro- und Präbiotika liegen.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines effizienten Produktionsverfahrens für Levan-basierte FOS, die eine vielversprechende Ergänzung für den Inulin dominierten Fruktan-Markt darstellen. Die biotechnologische Synthese von FOS bietet zahlreiche Vorteile, da mikrobielle Produktionsverfahren nur bedingt durch abiotische Faktoren beeinflusst werden und daher ein stabiles Produktspektrum gewährleisten. Diese Vorteile sollten in dieser Arbeit genutzt werden, um aufbauend auf *Gluconobacter japonicus* LMG 1417 einen skalierbaren Prozess zur Produktion von Levan und Levan-basierten FOS zu etablieren.

- 1) Das Essigsäurebakterium *G. japonicus* LMG 1417 produzierte auf Saccharose-haltigen Agarplatten große Mengen eines unbekanntes EPS. Durch analytische Nachweismethoden (<sup>13</sup>C-NMR- und FTIR-Spektroskopie) wurde gezeigt, dass es sich bei dem EPS um das β-2,6-glykosidisch verknüpfte Fruktanpolymer Levan handelt. Die *in-vivo* Produktion des vielversprechenden Präbiotikums durch *G. japonicus* LMG 1417 wurde sowohl durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen, Kultivierungsart und die Plasmid-vermittelte homologe Expression der Levansucrase LevS1417 optimiert. Durch die Verwendung von Kulturüberstand der Stämme *G. japonicus* LMG 1417 und *G. japonicus* LMG 1417 pBBR1\_p264\_levS1417 wurde eine Zell-freie Levan-Produktion etabliert, die eine maximale Levan-Ausbeute von  $157,9 \pm 7,6 \text{ g L}^{-1}$  erzielte. Dieses Verfahren umgeht die aufwändige Abtrennung von Zellen aus den hochviskosen Reaktionslösungen entsprechender Levan-Produktionen und ermöglicht zeitgleich sehr hohe Produkt-Ausbeuten.
- 2) Nach heterologer Expression der Levansucrase LevS1417 aus *G. japonicus* LMG 1417 in *E. coli* NEB5-alpha und anschließender Aufreinigung wurde das rekombinante Enzym eingehend charakterisiert. Durch die Erstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik wurde deutlich, dass LevS1417 mit  $2826 \pm 102 \text{ U mg}^{-1}$  die höchste spezifische Aktivität aufweist, die jemals für ein Enzym dieser Enzymklasse gemessen wurde. Zugleich wurde mit der beschriebenen Levansucrase erstmals ein Levan-produzierendes Enzym aus der Gattung *Gluconobacter* heterolog in *E. coli* produziert, aufgereinigt und charakterisiert.
- 3) Zur qualitativen und quantitativen Analyse Levan-basierter FOS konnte ein chromatographisches Nachweisverfahren auf Basis der HPLC-Methode etabliert werden. Eine Auswahl verschiedener Trennsäulen zur Analytik von FOS wurde hinsichtlich optimaler Trennleistung und Trennzeit untersucht. Von den untersuchten Säulen zeigte die Polymer-basierte Aminophase Asahipak NH2P-50 3E die besten Eigenschaften für die beabsichtigte Applikation. Die Säule ermöglichte bei niedrigen Flussraten eine Basislinien-getrennte Auftrennung von Fruktooligosacchariden. Dabei konnten auch FOS mit gleichem DP aber variierendem Verknüpfungstypen durch die Asahipak-Säulenkonfiguration voneinander separiert werden.

- 4) Um polymeres Levan, welches durch die katalytische Aktivität von Levansucrasen produziert wird, in präbiotische FOS zu hydrolysieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Endolevanasen heterolog in *E. coli* NEB5-alpha produziert. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme wurde gezeigt, dass die hier erstmals charakterisierte Endolevanase LevB<sub>2286</sub> aus *A. chroococcum* DSM 2286 optimale, hydrolytische Eigenschaften aufweist. Das Enzym produzierte ausgehend von polymerem Levan FOS mit einem DP zwischen 2 und 8. Einzigartig war die Tatsache, dass das Enzym auch bei deutlich verlängerter Inkubation die produzierten FOS nur in sehr geringem Maß weiter hydrolysierte. Dadurch erfüllt ein Großteil der durch LevB<sub>2286</sub> gebildeten Hydrolyseprodukte den für die Ballaststoff-Deklaration notwendigen Polymerisierungsgrad von mindestens drei Monomer-Einheiten. Neben den vorteilhaften hydrolytischen Eigenschaften wies LevB<sub>2286</sub> zusätzlich eine äußerst hohe spezifische Aktivität von  $6685 \pm 224 \text{ U mg}^{-1}$  auf. Aufgrund der hohen Umsatzrate und des einzigartigen Produktspektrum erwies sich LevB<sub>2286</sub> als ideal für die enzymatische Produktion Levan-basierter FOS
- 5) Durch simultane Aktivität der rekombinanten Enzyme LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> konnten ausgehend von Saccharose in einem einzigen Reaktionsansatz Levan-basierte FOS produziert werden. Um die Kosten- und Zeit-aufwändige Aufreinigung der rekombinanten Proteine zu umgehen, wurde die Produktion der Levan-basierten FOS unter Verwendung von *E. coli* Rohextrakt realisiert. In diesem Zusammenhang konnte ein initiales 2-Stamm-System, bei dem der Extrakt von zwei verschiedenen *E. coli* Stämmen zwecks FOS-Produktion vereint wurde, durch ein 1-Stamm-System ersetzt werden. Das dafür konstruierte Plasmid ermöglichte die simultane Produktion von LevS1417 und LevB<sub>2286</sub> in *E. coli*. Durch eine Optimierung der Ribosomenbindestelle konnte die Raum-Zeit-Ausbeute der Levan-FOS-Produktion noch weiter gesteigert werden.
- 6) Das von Bassalo *et al.* entwickelte System zur genomischen Integration von Nukleotidsequenzen wurde in dieser Arbeit für die Integration der Levansucrase-kodierenden Sequenz in das Genom von *E. coli* BW 25113 eingesetzt. Die erstellte Integrationsmutante war ohne die Zugabe eines Antibiotikums und/oder Induktors zur Produktion der Levansucrase LevS1417 befähigt, generierte im Vergleich zu den Plasmid-tragenden Stämmen jedoch erwartungsgemäß geringere Mengen an rekombinantem Protein. Die multiple Integration der LevS1417-kodierenden Nukleotidsequenz in verschiedene Loci des *E. coli* Genoms stellt somit ein vielversprechendes Mittel für eine Steigerung der Protein-Ausbeute dar.

## 6. Literaturverzeichnis

- ABDALLAH, J., MIHOUB, M., GAUTIER, V., & RICHARME, G. (2016).** The DJ-1 superfamily members YhbO and YajL from *Escherichia coli* repair proteins from glycation by methylglyoxal and glyoxal. *Biochemical and biophysical research communications*, 470(2), 282-286.
- ABOU-TALEB, K. A., ABDEL-MONEM, M. O., YASSIN, M. H., & DRAZ, A. A. (2015).** Production, purification and characterization of levan polymer from *Bacillus lentus* V8 strain. *Microbiology Research Journal International*, 22-32.
- 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.
- ALFALEH, K., & ANABREES, J. (2014).** Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*, 9(3), 584-671.
- 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. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(11), 1783-1796.
- AMEYAMA, M. (1975).** *Gluconobacter oxydans* subsp. *sphaericus*, new subspecies isolated from grapes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 25(4), 365-370.
- ARBOLEYA, S., WATKINS, C., STANTON, C., & ROSS, R. P. (2016).** Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Frontiers in microbiology*, 7, 1204.
- ARNDT, T. (2019).** Lyophilisation. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1549-1549). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 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. *Journal of applied microbiology*, 121(1), 263-276.
- BALTHAZAR, C. F., JÚNIOR, C. C., MORAES, J., COSTA, M. P., RAICES, R. S. L., FRANCO, R. M., CRUZ, A. G. & SILVA, A. C. O. (2016).** Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4160-4168.
- BARONE, J. R., & MEDYNETS, M. (2007).** Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate polymers*, 69(3), 554-561.

- BASRAN, N. F., MUSTAFA, S., SHAMSUDDIN, R. A., ALI, A. M., NOORMI, R., & SUBRAMANIAM, S. (2010).** Isolation and cloning of an inulinase gene from an endophytic bacteria. *Advances in Environmental Biology*, 4(3), 392-396.
- BASSALO, M. C., GARST, A. D., HALWEG-EDWARDS, A. L., GRAU, W. C., DOMAILLE, D. W., MUTALIK, V. K., ARKIN, A. P. & GILL, R. T. (2016).** Rapid and efficient one-step metabolic pathway integration in *E. coli*. *ACS synthetic biology*, 5(7), 561-568.
- BATTLING, S., WOHLERS, K., IGWE, C., KRANZ, A., PESCH, M., WIRTZ, A., BAUMGART, M., BÜCHS, J. & BOTT, M. (2020).** Novel plasmid-free *Gluconobacter oxydans* strains for production of the natural sweetener 5-ketofructose. *Microbial cell factories*, 19(1), 1-15.
- BEKERS, M., LAUKEVICS, J., UPITE, D., KAMINSKA, E., VIGANTS, A., VIESTURS, U., PANKOVA, L. & DANILEVICS, A. (2002).** Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38(5), 701-706.
- BELONGUER, A., DUNCAN, S. H., CALDER, A. G., HOLTROP, G., LOUIS, P., LOBLEY, G. E., & FLINT, H. J. (2006).** Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3593-3599.
- BHOSALE, S. H., RAO, M. B., & DESHPANDE, V. V. (1996).** Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological reviews*, 60(2), 280-300.
- BIELY, P., MISLOVIČOVÁ, D., & TOMAN, R. (1988).** Remazol brilliant blue-xylan: a soluble chromogenic substrate for xylanases. In *Methods in enzymology* (Vol. 160, pp. 536-541). Academic Press.
- BIELY, P., MISLOVIČOVÁ, D., & TOMAN, R. (1985).** Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1, 4- $\beta$ -xylanases and endo-1, 4- $\beta$ -glucanases. *Analytical biochemistry*, 144(1), 142-146.
- BINDER, H. J. (2010).** Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annual review of physiology*, 72, 297-313.
- BLACKWOOD, A. C., GUIMBERTEAU, G., & PENAUD, E. (1969).** Sur les bactéries acétiques isolées de raisins. *CR Seances Acad. Sci. Serv. D*, 269, 802-804.
- BLAKE, J. D., CLARKE, M. L., JANSSON, P. E., & MCNEIL, K. E. (1982).** Fructan from *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology*, 151(3), 1595-1597.
- BLOMFIELD, I. C., VAUGHN, V., REST, R. F., & EISENSTEIN, B. I. (1991).** Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Molecular microbiology*, 5(6), 1447-1457.

- BLUM, H., BEIER, H., & GROSS, H. J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- BOETS, E., GOMAND, S. V., DEROOVER, L., PRESTON, T., VERMEULEN, K., DE PRETER, V., HAMER, H. M., VAN DEN MOOTER, G., DE VUYST, L., COURTIN, C. M., ANNAERT, P., DELCOUR, J. A. & VERBEKE, K. A. (2017).** Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. *The Journal of physiology*, 595(2), 541-555.
- BOOIJINK, C. C., EL-AIDY, S., RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M., HEILIG, H. G., TROOST, F. J., SMIDT, H., KLEEREBEZEM, M., DE VOS, W. M. & ZOETENDAL, E. G. (2010).** High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental microbiology*, 12(12), 3213-3227.
- BOYER, R. F., & REDMOND, M. A. (1983).** Effect of chemical modification of cellulose on the activity of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(5), 1311-1319.
- BRADFORD, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- BUCHNER, E. (1897).** Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 30(1), 1110-1113.
- BYUN, B. Y., LEE, S. J., & MAH, J. H. (2014).** Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$ -2, 6-fructan), a multifunctional polysaccharide. *International journal of food science & technology*, 49(1), 238-245.
- CABEZAS, M. J., RABERT, C., BRAVO, S., & SHENE, C. (2002).** Inulin and sugar contents in *Helianthus tuberosus* and *Cichorium intybus* tubers: effect of postharvest storage temperature. *Journal of food science*, 67(8), 2860-2865.
- CALAZANS, G. M., LIMA, R. C., DE FRANÇA, F. P., & LOPES, C. E. (2000).** Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), 245-247.
- CARLSON, E. D., GAN, R., HODGMAN, C. E., & JEWETT, M. C. (2012).** Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnology advances*, 30(5), 1185-1194.
- CARR, P. W., WANG, X., & STOLL, D. R. (2009).** Effect of pressure, particle size, and time on optimizing performance in liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 81(13), 5342-5353.
- CASTRO, G. R., BAIGORÍ, M. D., & SIÑERIZ, F. (1995).** A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 22(1), 51-56.



- CHA, J., PARK, N. H., YANG, S. J., & LEE, T. H. (2001).** Molecular and enzymatic characterization of a levan fructotransferase from *Microbacterium* sp. AL-210. *Journal of biotechnology*, 91(1), 49-61.
- CHAMBERT, R., & PETIT-GLATRON, M. F. (1989).** Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydrate research*, 191(1), 117-123.
- CHAMBERT, R., TREBOUL, G., & DEDONDER, R. (1974).** Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 41(2), 285-300.
- CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., & COLLINS, J. K. (1998).** Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 84(5), 759-768.
- CHEN, H., BJERKNES, M., KUMAR, R., & JAY, E. (1994).** Determination of the optimal aligned spacing between the Shine–Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* m RNAs. *Nucleic acids research*, 22(23), 4953-4957.
- CHERRINGTON, C. A., HINTON, M., PEARSON, G. R., & CHOPRA, I. (1991).** Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(2), 161-165.
- CHURMS, S. C. (1996).** Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. *Journal of chromatography A*, 720(1-2), 75-91.
- CLARET, C., SALMON, J. M., ROMIEU, C., & BORIES, A. (1994).** Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied microbiology and biotechnology*, 41(3), 359-365.
- COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2012).** Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.
- CROTTI, E., RIZZI, A., CHOUAIA, B., RICCI, I., FAVIA, G., ALMA, A., SACCHI, L., BOURTZIS, K., MANDRIOLI, M., CHERIF, A., BANDI, C. & DAFFONCHIO, D. (2010).** Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6963-6970.

- CUMMINGS, J., 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.
- DANISH, M., MUMTAZ, M. W., FAKHAR, M., & RASHID, U. (2017). Response Surface Methodology based Optimized Purification of the Residual Glycerol from Biodiesel Production Process. *Chiang Mai Journal of Science*, 44(4), 1570-1582.
- DATSENKO, K. A., & WANNER, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.
- DATTA, S., COSTANTINO, N., & COURT, D. L. (2006). A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene*, 379, 109-115.
- DAWES, E. A., RIBBONS, D. W., & REES, D. A. (1966). Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochemical Journal*, 98(3), 804-812.
- DE SIQUEIRA, E. C., DE SOUZA REBOUÇAS, J., PINHEIRO, I. O., & FORMIGA, F. R. (2020). Levan-based nanostructured systems: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 119242.
- DE SMIT, M. H., & VAN DUIN, J. (1990). Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7668-7672.
- DENG, H., LI, Z., TAN, Y., GUO, Z., LIU, Y., WANG, Y., YUAN, Y., YANG, R., BI, Y., BAI, Y. & ZHI, F. (2016). A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- DEPPENMEIER, U., HOFFMEISTER, M., & PRUST, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 233-242.
- 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., THISSEN, 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.
- DINAN, T. G., STANTON, C., & CRYAN, J. F. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological psychiatry*, 74(10), 720-726.
- DOELLE, H. W., KIRK, L., CRITTENDEN, R., TOH, H., & DOELLE, M. B. (1993). *Zymomonas mobilis*—science and industrial application. *Critical reviews in biotechnology*, 13(1), 57-98.

- DOS SANTOS, L. F., DE MELO, F. B. C., PAIVA, W. M., BORSATO, D., DA SILVA, M. C. C., & CELLIGOI, M. P. C. (2013).** Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATTO. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(4), 8413-8422.
- DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E. (2014).** The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213).
- DUNCAN, S. H., LOUIS, P., THOMSON, J. M., & FLINT, H. J. (2009).** The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 11(8), 2112-2122.
- DUTTA, A. (2017).** Fourier transform infrared spectroscopy. In *Spectroscopic methods for nanomaterials characterization* (pp. 73-93). Elsevier.
- EHRlich, J., STIVALA, S. S., BAHARY, W. S., GARG, S. K., LONG, L. W., & NEWBRUN, E. (1975).** Levans: I. Fractionation, solution viscosity, and chemical analysis of levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Journal of dental research*, 54(2), 290-297.
- EISENTHAL, R., PETERSON, M. E., DANIEL, R. M., & DANSON, M. J. (2006).** The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 24(7), 289-292.
- ELISHASHVILI, V. I. (1980).** Purification and properties of levansucrase of *Gluconobacter oxydans* L-1. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 45(1), 20-27.
- 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*. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- ERNY, D., DE ANGELIS, A. L. H., JAITIN, D., WIEGHOFER, P., STASZEWSKI, O., DAVID, E., KERENSHAUL, H., MAHLAKOIV, T., JAKOBSHAGEN, K., BUCH, T., SCHWIERZECK, V., UTERMÖHLEN, O., CHUN, E., GARETT, W. S., MCCOY, K. D., DIEFENBACH, A., STAEHEL, P., STECHER, B., AMIT, I. & SCHWIERZECK, V. (2015).** Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*, 18(7), 965-977.
- ESAWY, M. A., AHMED, E. F., HELMY, W. A., MANSOUR, N. M., EL-SENOUSY, W. M., & EL-SAFY, M. M. (2011).** Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate polymers*, 86(2), 823-830.
- EUZENAT, O., GUIBERT, A., & COMBES, D. (1997).** Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32(3), 237-243.
- EWASCHUK, J. B., & DIELEMAN, L. A. (2006).** Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(37), 5941.

- FERNANDEZ, E. M., VALENTI, V., ROCKEL, C., HERMANN, C., POT, B., BONECA, I. G., & GRANGETTE, C. (2011).** Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 60(8), 1050-1059.
- FILIPPOV, M. P. (1992).** Practical infrared spectroscopy of pectic substances. *Food Hydrocolloids*, 6(1), 115-142.
- FINKENSTADT, V. L., CÔTÉ, G. L., & WILLETT, J. L. (2011).** Corrosion protection of low-carbon steel using exopolysaccharide coatings from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology letters*, 33(6), 1093-1100.
- FLAMM, G., GLINSMANN, W., KRITCHEVSKY, D., PROSKY, L., & ROBERFROID, M. (2001).** Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41(5), 353-362.
- FLICKINGER, M. C., & PERLMAN, D. (1977).** Application of oxygen-enriched aeration in the conversion of glycerol to dihydroxyacetone by *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Applied and environmental microbiology*, 33(3), 706-712.
- FOSTER, J. A., & NEUFELD, K. A. M. (2013).** Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36(5), 305-312.
- FREDUA-AGYEMAN, M., & GAISFORD, S. (2015).** Comparative survival of commercial probiotic formulations: tests in biorelevant gastric fluids and real-time measurements using microcalorimetry. *Beneficial microbes*, 6(1), 141-151.
- FRIEDRICH, B., HACKFORT, S., BOYER, M., & GOTTSCHLICH, D. (2019).** Conflicts over GMOs and their contribution to food democracy. *Politics and Governance*, 7(4), 165-177.
- FULLER, R. (1991).** Probiotics in human medicine. *Gut*, 32(4), 439.
- FUNG, T. C., OLSON, C. A., & HSIAO, E. Y. (2017).** Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature neuroscience*, 20(2), 145.
- 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. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491.
- GIBSON, G. R., PROBERT, H. M., VAN LOO, J., RASTALL, R. A., & ROBERFROID, M. B. (2004).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17(2), 259-275.

- GIBSON, G. R., & ROBERFROID, M. B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- GIBSON, G. R., & WANG, X. (1994).** Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS microbiology letters*, 118(1-2), 121-127.
- GILLIS, M., KERSTERS, K., HOSTE, B., JANSSENS, D., KROPPENSTEDT, R. M., STEPHAN, M. P., TEIXEIRA, K. R. S., DOBEREINER, J. & DE LEY, J. (1989).** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 39(3), 361-364.
- GOLDENBERG, J. Z., YAP, C., LYTVYN, L., LO, C. K. F., BEARDSLEY, J., MERTZ, D., & JOHNSTON, B. C. (2017).** Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12).
- GOTTLIEB, H. E., KOTLYAR, V., & NUDELMAN, A. (1997).** NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *The Journal of organic chemistry*, 62(21), 7512-7515.
- GU, Y., ZHENG, J., FENG, J., CAO, M., GAO, W., QUAN, Y., DANG, Y., WANG, Y., WANG, S. & SONG, C. (2017).** Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(10), 4163-4174.
- GUPTA, A., SINGH, V. K., QAZI, G. N., & KUMAR, A. (2001).** *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(3), 445-456.
- GUTERL, J. K., GARBE, D., CARSTEN, J., STEFFLER, F., SOMMER, B., REIßE, S., PHILIPP, A., HAACK, M., RÜHRMANN, B., KOLTERMANN, A., KETTLING, U., BRÜCK, T. & SIEBER, V. (2012).** Cell-free metabolic engineering: production of chemicals by minimized reaction cascades. *ChemSusChem*, 5(11), 2165-2172.
- HAMDY, A. A., ELATTAL, N. A., AMIN, M. A., ALI, A. E., MANSOUR, N. M., AWAD, G. E., FARRAG, A. R. H. & ESAWY, M. A. (2018).** In vivo assessment of possible probiotic properties of *Bacillus subtilis* and prebiotic properties of levan. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 13, 190-197.
- HAN, Y. W. (1990).** Microbial levan. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 35, pp. 171-194). Academic Press.
- HAN, Y. W., & CLARKE, M. A. (1990).** Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(2), 393-396.

- HANKE, T., RICHHARDT, J., POLEN, T., SAHM, H., BRINGER, S., & BOTT, M. (2012). Influence of oxygen limitation, absence of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex and low pH on global gene expression in *Gluconobacter oxydans* 621H using DNA microarray technology. *Journal of biotechnology*, 157(3), 359-372.
- HAO, Q., DONG, B. R., & WU, T. (2015). Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
- 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. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(7), 3217-3228.
- HENSON, C. A., & LIVINGSTON III, D. P. (1996). Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes [beta]-2, 6-fructans. *Plant Physiology*, 110(2), 639-644.
- HERBRETEAU, B., VILLETTE, V., LAFOSSE, M., & DREUX, M. (1995). Analysis of oligosaccharides using aminobonded silica gel and a ternary eluent with evaporative light scattering detection. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 351(2-3), 246-250.
- HERNÁNDEZ, L., ARRIETA, J., BETANCOURT, L., FALCÓN, V., MADRAZO, J., COEGO, A., & MENÉNDEZ, C. (1999). Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current microbiology*, 39(3), 146-152.
- HERNANDEZ, L., ARRIETA, J., MENENDEZ, C., VAZQUEZ, R., COEGO, A., SUAREZ, V., SELMAN, G., PETIT-GLATRON, M. F. & CHAMBERT, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical Journal*, 309(1), 113-118.
- HERWEG, E., SCHÖPPING, M., ROHR, K., SIEMEN, A., FRANK, O., HOFMANN, T., DEPPENMEIER, U. & BÜCHS, J. (2018). Production of the potential sweetener 5-ketofructose from fructose in fed-batch cultivation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource technology*, 259, 164-172.
- HEUVELIN, E., LEBRETON, C., GRANGETTE, C., POT, B., CERF-BENSUSSAN, N., & HEYMAN, M. (2009). Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One*, 4(4), e5184.
- HILJOVA, E., & CHMELAROVA, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské lekárské listy*, 108(8), 354.
- HILL, A., CHEN, L., MARIAGE, A., PETIT, J. L., DE BERARDINIS, V., & KARBOUNE, S. (2019). Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic

- activity to produce levan and fructooligosaccharides. *Catalysis Science & Technology*, 9(11), 2931-2944.
- 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).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.
- HOFFMANN, J. J., HÖVELS, M., KOSCIOW, K., & DEPPENMEIER, U. (2020).** Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *Journal of biotechnology*, 307, 164-174.
- 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*. *Biochemical Journal*, 407(2), 189-198.
- HÖVELS, M., KOSCIOW, K., KNIEWEL, J., JAKOB, F., & DEPPENMEIER, U. (2020).** High yield production of levan-type fructans by *Gluconobacter japonicus* LMG 1417. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 295-303.
- HSU, P. D., LANDER, E. S., & ZHANG, F. (2014).** Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- HUEBNER, J., WEHLING, R. L., & HUTKINS, R. W. (2007).** Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7), 770-775.
- HUNDSHELL, C. S., BRAUN, A., WEFERS, D., VOGEL, R. F., & JAKOB, F. (2020).** Size-dependent variability in flow and viscoelastic behavior of levan produced by *Gluconobacter albidus* TMW 2.1191. *Foods*, 9(2), 192.
- HVIID, A., SVANSTRÖM, H., & FRISCH, M. (2011).** Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut*, 60(1), 49-54.
- ICHIKAWA, H., & SAKATA, T. (1998).** Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive. *The Journal of nutrition*, 128(5), 843-847.
- IGARASHI, T., TAKAHASHI, M., YAMAMOTO, A., ETOH, Y., & TAKAMORI, K. (1987).** Purification and characterization of levansucrase from *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. *Infection and immunity*, 55(12), 3001-3005.
- JAKOB, F., MEIBNER, D., & VOGEL, R. F. (2012).** Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species. *Acetic Acid Bacteria*, 1(1), e2-e2.

- JAKOB, F., PFAFF, A., NOVOA-CARBALLAL, R., RÜBSAM, H., BECKER, T., & VOGEL, R. F. (2013).** Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1234-1242.
- JAKOB, F., QUINTERO, Y., MUSACCHIO, A., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., HERNÁNDEZ, L., & VOGEL, R. F. (2019).** Acetic acid bacteria encode two levansucrase types of different ecological relationship. *Environmental microbiology*, 21(11), 4151-4165.
- JANG, K. H., KANG, S. A., CHO, Y. H., KIM, Y. Y., LEE, Y. J., HONG, K. H., SEONG, K. H., KIM, S. H., KIM, C. H., HA, S. D. & CHOUE, R. W. (2003A).** Prebiotic properties of levan in rats. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(3), 348-353.
- JANG, K. H., RYU, E. J., PARK, B. S., SONG, K. B., KANG, S. A., KIM, C. H., UHM, T. B., PARK, Y. I. & RHEE, S. K. (2003B).** Levan fructotransferase from *Arthrobacter oxydans* J17-21 catalyzes the formation of the di-D-fructose dianhydride IV from levan. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(9), 2632-2636.
- JEFFERY, I. B., O'TOOLE, P. W., ÖHMAN, L., CLAESSON, M. J., DEANE, J., QUIGLEY, E. M., & SIMRÉN, M. (2012).** An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*, 61(7), 997-1006.
- JENSEN, S. L., DIEMER, M. B., LUNDMARK, M., LARSEN, F. H., BLENNOW, A., MOGENSEN, H. K., & NIELSEN, T. H. (2016).** Levansucrase from *Bacillus subtilis* hydrolyses  $\beta$ -2, 6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. *International journal of biological macromolecules*, 85, 514-521.
- JEONG, H., KIM, H. J., & LEE, S. J. (2015).** Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *Genome announcements*, 3(2).
- JESKE, L., PLACZEK, S., SCHOMBURG, I., CHANG, A., & SCHOMBURG, D. (2019).** BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. *Nucleic acids research*, 47(D1), D542-D549.
- JOSHI, D., ROY, S., & BANERJEE, S. (2018).** Prebiotics: a functional food in health and disease. In *Natural products and drug discovery* (pp. 507-523). Elsevier.
- KALLNIK, V., MEYER, M., DEPPENMEIER, U., & SCHWEIGER, P. (2010).** Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of biotechnology*, 150(4), 460-465.
- KANG, E., LEE, S. O., LEE, J. D., & LEE, T. H. (1999).** Purification and characterization of a levanbiose-producing levansucrase from *Pseudomonas* sp. No. 43. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29(3), 263-268.



- KASAPIS, S., MORRIS, E. R., GROSS, M., & RUDOLPH, K. (1994).** Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydrate Polymers*, 23(1), 55-64.
- KATSURA, K., YAMADA, Y., UCHIMURA, T., & KOMAGATA, K. (2002).** *Gluconobacter asaii* Mason and Claus 1989 is a junior subjective synonym of *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5), 1635-1640.
- KAWAKAMI, A., & YOSHIDA, M. (2005).** Fructan: fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*, 223(1), 90.
- KEKEZ, B. D., GOJGIC-CVIJOVIC, G. D., JAKOVLJEVIC, D. M., KOJIC, J. S., MARKOVIC, M. D., BESKOSKI, V. P., & VRVIC, M. M. (2015).** High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(6), 3068-3083.
- KELLY, G. (2008).** Inulin-Type Prebiotics -- A Review: Part 1. *Alternative Medicine Review*, 13(4).
- KELLY, G. (2009).** Inulin-Type Prebiotics -- A Review: Part 2. *Alternative Medicine Review*, 14(1).
- KIEFLER, I., BRINGER, S., & BOTT, M. (2017).** Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* 621H for increased biomass yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(13), 5453-5467.
- KIM, S. J., BAE, P. K., & CHUNG, B. H. (2015).** Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chemical Communications*, 51(1), 107-110.
- KLEEREBEZEM, M., & VAUGHAN, E. E. (2009).** Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual review of microbiology*, 63, 269-290.
- KO, H., BAE, J. H., SUNG, B. H., KIM, M. J., KIM, C. H., OH, B. R., & SOHN, J. H. (2019).** Efficient production of levan using a recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* hypersecreting a bacterial levansucrase. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 46(11), 1611-1620.
- KOLIDA, S., & GIBSON, G. R. (2011).** Synbiotics in health and disease. *Annual review of food science and technology*, 2, 373-393.
- KOSCIOW, K (2017).** Untersuchungen zur Erweiterung des Substratspektrums von *Gluconobacter oxydans*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- KORNMANN, H., DUBOC, P., MARISON, I., & VON STOCKAR, U. (2003).** Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. *Applied and environmental microbiology*, 69(10), 6091-6098.

- KOVACH, M. E., ELZER, P. H., HILL, D. S., ROBERTSON, G. T., FARRIS, M. A., ROOP II, R. M., & PETERSON, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175-176.
- KOWALSKI, K., & MULAK, A. (2019).** Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 25(1), 48.
- KRALJ, S., BUCHHOLZ, K., DIJKHUIZEN, L., & SEIBEL, J. (2008).** Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: a new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(1-2), 32-41.
- KRUMBECK, J. A., MALDONADO-GOMEZ, M. X., MARTÍNEZ, I., FRESE, S. A., BURKEY, T. E., RASINENI, K., RAMER-TAIT, A. E., HARRIS, E. N., HUTKINS, R. W. & WALTER, J. (2015).** In vivo selection to identify bacterial strains with enhanced ecological performance in synbiotic applications. *Applied and environmental microbiology*, 81(7), 2455-2465.
- KRUMBECK, J. A., MALDONADO-GOMEZ, M. X., RAMER-TAIT, A. E., & HUTKINS, R. W. (2016).** Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. *Current opinion in gastroenterology*, 32(2), 110-119.
- KUDLA, G., MURRAY, A. W., TOLLERVEY, D., & PLOTKIN, J. B. (2009).** Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *science*, 324(5924), 255-258.
- KUHN, R. C., & MAUGERI FILHO, F. (2010).** Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. *New biotechnology*, 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. *Journal of Membrane Science*, 365(1-2), 356-365.
- KUHN, R. C., MAZUTTI, M. A., ALBERTINI, L. B., & MAUGERI FILHO, F. (2014).** Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. *New biotechnology*, 31(3), 237-241.
- KUMAR, M., NAGPAL, R., VERMA, V., KUMAR, A., KAUR, N., HEMALATHA, R., GAUTAM, S. K. & SINGH, B. (2013).** Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition reviews*, 71(1), 23-34.
- LAEMMLI, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- LAURSEN, B. S., SØRENSEN, H. P., MORTENSEN, K. K., & SPERLING-PETERSEN, H. U. (2005).** Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(1), 101-123.

- LEPAGE, P., HÄSLER, R., SPEHLMANN, M. E., REHMAN, A., ZVIRBLIENE, A., BEGUN, A., OTT, S., KUPCINSKAS, L., DORÉ, J., RAEDLER, A. & SCHREIBER, S. (2011). Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 141(1), 227-236.
- LI, L., CLEENWERCK, I., DE VUYST, L., & VANDAMME, P. (2017). Identification of acetic acid bacteria through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and report of *Gluconobacter nephelii* Kommanee et al. 2011 and *Gluconobacter uchimurae* Tanasupawat et al. 2012 as later heterotypic synonyms of *Gluconobacter japonicus* Malimas et al. 2009 and *Gluconobacter oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961 (Approved Lists 1980) emend. Gosselé et al. 1983, respectively. *Systematic and applied microbiology*, 40(3), 123-134.
- LI, M., SEO, S., & KARBOUNE, S. (2015A). *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase-catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. *Carbohydrate polymers*, 133, 203-212.
- LI, W., ZHANG, J., YU, C., LI, Q., DONG, F., WANG, G., GU, G. & GUO, Z. (2015B). Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. *Carbohydrate Polymers*, 121, 315-319.
- LIANG, T. W., & WANG, S. L. (2015). Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities. *Marine drugs*, 13(4), 1847-1863.
- LIN, S. C., & LEE, W. C. (1998). Separation of a fructo-oligosaccharide mixture by hydrophilic interaction chromatography using silica-based micropellicular sorbents. *Journal of Chromatography A*, 803(1-2), 302-306.
- LIU, C., KOLIDA, S., CHARALAMPOPOULOS, D., & RASTALL, R. A. (2020). An evaluation of the prebiotic potential of microbial levans from *Erwinia* sp. 10119. *Journal of Functional Foods*, 64, 103668.
- LIU, J., LUO, J., YE, H., & ZENG, X. (2012). Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 767-772.
- LOPEZ, M. G., MANCILLA-MARGALLI, N. A., & MENDOZA-DIAZ, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-7840.
- LORENZETTI, M. F., MORO, M. R., & GARCÍA-CRUZ, C. H. (2015). Alginate/PVA Beads for Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Food Process Engineering*, 38(1), 31-36.

- LUCHTERHAND, B., FISCH, T., GRIMM, A. R., WEWETZER, S., WUNDERLICH, M., SCHLEPÜTZ, T., & BÜCHS, J. (2015).** Quantifying the sensitivity of *G. oxydans* ATCC 621H and DSM 3504 to osmotic stress triggered by soluble buffers. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(4), 585-600.
- MANICHANH, C., BORRUEL, N., CASELLAS, F., & GUARNER, F. (2012).** The gut microbiota in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 599-608.
- MARDO, K., VISNAPUU, T., VIJA, H., AASAMETS, A., VIIGAND, K., & ALAMÄE, T. (2017).** A highly active endo-levanase BT1760 of a dominant mammalian gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* cleaves not only various bacterial levans, but also levan of timothy grass. *PLoS one*, 12(1), e0169989.
- MARKOWIAK, P., & ŚLIŻEWSKA, K. (2017).** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- MARX, S. P., NÖSBERGER, J., & FREHNER, M. (1997).** Hydrolysis of fructan in grasses: a  $\beta$ -(2-6)-linkage specific fructan- $\beta$ -fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *The New Phytologist*, 135(2), 279-290.
- MARX, S. P., WINKLER, S., & HARTMEIER, W. (2000).** Metabolization of  $\beta$ -(2, 6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS microbiology letters*, 182(1), 163-169.
- MASON, L. M., & CLAUS, G. W. (1989).** Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(2), 174-184.
- MATSUSHITA, K., NAGATANI, Y. I., SHINAGAWA, E., ADACHI, O., & AMEYAMA, M. (1989).** Effect of extracellular pH on the respiratory chain and energetics of *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and biological chemistry*, 53(11), 2895-2902.
- MCKELLAR, R. C., MODLER, H. W., & MULLIN, J. (1993).** Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on fructooligosaccharides. *Bifidobacteria and Microflora*, 12(2), 75-86.
- MENSINK, M. A., FRIJLINK, H. W., VAN DER VOORT MAARSCHALK, K., & HINRICHS, W. L. (2015).** Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate polymers*, 130, 405-419.
- MESSAOUDI, M., LALONDE, R., VIOLLE, N., JAVELOT, H., DESOR, D., NEJDI, A., BISSON, J. F., ROUGEOT, C., PICHELIN, M., CAZAUBIEL, M. & CAZAUBIEL, J. M. (2011).** Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and

- Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 755-764.
- METCHNIKOFF, E. (1907).** Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London, 161-183.
- MIASNIKOV, A. N. (1997).** Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. *FEMS microbiology letters*, 154(1), 23-28.
- MIQUEL, S., MARTIN, R., ROSSI, O., BERMUDEZ-HUMARAN, L. G., CHATEL, J. M., SOKOL, H., THOMAS, M., WELLS, J. M. & LANGELLA, P. (2013).** *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current opinion in microbiology*, 16(3), 255-261.
- MOHAMMADI, A. A., JAZAYERI, S., KHOSRAVI-DARANI, K., SOLATI, Z., MOHAMMADPOUR, N., ASEMI, Z., ADAB, Z., DJALALI, M., THERANI-DOOST, M., HOSSEINI, M. & EGHTESEADI, S. (2016).** The effects of probiotics on mental health and hypothalamic–pituitary–adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutritional neuroscience*, 19(9), 387-395.
- MOLINARI, M. L., & BOIARDI, J. L. (2013).** Levans production by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 7-7.
- MONCRIEF, J. S., DUNCAN, A. J., WRIGHT, R. L., BARROSO, L. A., & WILKINS, T. D. (1998).** Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity islet of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Infection and immunity*, 66(4), 1735-1739.
- MOSTAFA, H. E., HELLER, K. J., & GEIS, A. (2002).** Cloning of *Escherichia coli* *lacZ* and *lacY* genes and their expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2619-2623.
- MOTIZUKI, K., TAKARAZUKA, I., & KANZAKI, T. (1966).** Method for producing 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent Office*, 3.
- MOURA, P., BARATA, R., CARVALHEIRO, F., GÍRIO, F., LOUREIRO-DIAS, M. C., & ESTEVES, M. P. (2007).** In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 963-972.
- MUELLER, S., SAUNIER, K., HANISCH, C., NORIN, E., ALM, L., MIDTVEDT, T., CRESCI, A., SILVI, S., ORPIANESI, C., VERDENELLI, M. C., CLAVEL, T., KOEBNICK, C., ZUNFT, H. J. F., DORÉ, J. & BLAUT, M. (2006).** Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1027-1033.

- MULLIS, K. B., & FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-350.
- MURAKAMI, H., MUROI, H., KURAMOTO, T., TAMURA, Y., MIZUTANI, K., NAKANO, H., & KITAHATA, S. (1990). Purification and some properties of a levanase from *Streptomyces* sp. no. 7-3. *Agricultural and biological chemistry*, 54(9), 2247-2255.
- MURAKAMI, H., KURAMOTO, T., MIZUTANI, K., NAKANO, H., & KITAHATA, S. (1992). Purification and some properties of a new levanase from *Bacillus* sp. No. 71. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(4), 608-613.
- NAKAPONG, S., PICHYANGKURA, R., ITO, K., IIZUKA, M., & PONGSAWASDI, P. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 54, 30-36.
- NAYAK, D., ROTH, T. L., & MCGAVERN, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual review of immunology*, 32, 367.
- NAYAK, D., ZINSELMAYER, B. H., CORPS, K. N., & MCGAVERN, D. B. (2012). In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *Intravital*, 1(2), 95-106.
- NGUYEN, S. K., SOPHONPUTTANAPHOCA, S., KIM, E., & PENNER, M. H. (2009). Hydrolytic methods for the quantification of fructose equivalents in herbaceous biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 158(2), 352-361.
- NOBRE, C., SEVERINO, A., RETAMAL, C., DE WEIRELD, G., WOUWER, A. V. D., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. (2010). Operating conditions of a simulated moving bed chromatography unit for the purification of fructooligosaccharides. In: *6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry 2010*.
- NOBRE, C., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. (2015). New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructo-oligosaccharides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(10), 1444-1455.
- NUÑEZ, P. A., SORIA, M., & FARBER, M. D. (2012). The twin-arginine translocation pathway in  $\alpha$ -proteobacteria is functionally preserved irrespective of genomic and regulatory divergence. *PLoS One*, 7(3), e33605.
- O'TOOLE, P. W., MARCHESI, J. R., & HILL, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature microbiology*, 2(5), 1-6.
- OBISO, R. J., AZGHANI, A. O., & WILKINS, T. D. (1997). The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infection and immunity*, 65(4), 1431-1439.

- ODAMAKI, T., KATO, K., SUGAHARA, H., HASHIKURA, N., TAKAHASHI, S., XIAO, J. Z., ABE, F. & OSAWA, R. (2016).** Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC microbiology*, 16(1), 1-12.
- OGAWA, T., ASAI, Y., TAMAI, R., MAKIMURA, Y., SAKAMOTO, H., HASHIKAWA, S., & YASUDA, K. (2006).** Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical & Experimental Immunology*, 143(1), 103-109.
- OHTSUKA, K., HINO, S., FUKUSHIMA, T., OZAWA, O., KANEMATSU, T., & UCHIDA, T. (1992).** Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(9), 1373-1377.
- OLVERA, C., CENTENO-LEIJA, S., & LÓPEZ-MUNGUÍA, A. (2007).** Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), 11-20.
- ÖNER, E. T., HERNÁNDEZ, L., & COMBIE, J. (2016).** Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology advances*, 34(5), 827-844.
- ORTIZ-SOTO, M. E., RIVERA, M., RUDINO-PINERA, E., OLVERA, C., & LÓPEZ-MUNGUÍA, A. (2008).** Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection*, 21(10), 589-595.
- OZIMEK, L. K., KRALJ, S., KAPER, T., VAN DER MAAREL, M. J., & DIJKHUIZEN, L. (2006A).** Single amino acid residue changes in subsite- 1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *The FEBS journal*, 273(17), 4104-4113.
- OZIMEK, L. K., KRALJ, S., VAN DER MAAREL, M. J., & DIJKHUIZEN, L. (2006B).** The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), 1187-1196.
- PASEEPHOL, T., & SHERKAT, F. (2009).** Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 311-318.
- PASSMORE, S. M., & CARR, J. G. (1975).** The ecology of the acetic acid bacteria with particular reference to cider manufacture. *Journal of Applied Bacteriology*, 38(2), 151-158.
- PAULIS, C. L., & BARRY, S. C. (1969).** A preliminary study of the incorporation of glucose-C14 in the enzymatic synthesis of sucrose and levan by the levansucrase system of *Streptococcus salivarius*. *Journal of the Baltimore College of Dental Surgery*, 24(1), 27-36.
- PETERS, B., JUNKER, A., BRAUER, K., MÜHLTHALER, B., KOSTNER, D., MIENTUS, M., LIEBL, W. & EHRENREICH, A. (2013).** Deletion of pyruvate decarboxylase by a new method for efficient

- markerless gene deletions in *Gluconobacter oxydans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), 2521-2530.
- POLI, A., KAZAK, H., GÜRLEYENDAĞ, B., TOMMONARO, G., PIERETTI, G., ÖNER, E. T., & NICOLAUS, B. (2009).** High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 651-657.
- POLI, A., NICOLAUS, B., DENIZCI, A. A., YAVUZTURK, B., & KAZAN, D. (2013).** *Halomonas smyrnensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 10-18.
- PORRAS-DOMÍNGUEZ, J. R., ÁVILA-FERNÁNDEZ, Á., MIRANDA-MOLINA, A., RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E., & MUNGUÍA, A. L. (2015).** *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate polymers*, 132, 338-344.
- PORRAS-DOMÍNGUEZ, J. R., ÁVILA-FERNÁNDEZ, Á., RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E., MIRANDA-MOLINA, A., ESCALANTE, A., GONZÁLEZ-CERVANTES, R., OLVERA, C. & MUNGUÍA, A. L. (2014).** Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783-790.
- PORRAS-DOMÍNGUEZ, J. R., RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E., ÁVILA-FERNÁNDEZ, Á., MONTIEL-SALGADO, S., & LÓPEZ-MUNGUÍA, A. (2017).** Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB). *Carbohydrate polymers*, 177, 40-48.
- PROHASZKA, L., JAYARAO, B. M., FABIAN, A., & KOVACS, S. (1990).** The role of intestinal volatile fatty acids in the *Salmonella* shedding of pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 37(1-10), 570-574.
- PRUST, C., HOFFMEISTER, M., LIESEGANG, H., WIEZER, A., FRICKE, W. F., EHRENREICH, A., GOTTSCHALK, G. & DEPPENMEIER, U. (2005).** Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature biotechnology*, 23(2), 195-200.
- QI, L. S., LARSON, M. H., GILBERT, L. A., DOUDNA, J. A., WEISSMAN, J. S., ARKIN, A. P., & LIM, W. A. (2013).** Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183.
- 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., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J. M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H. B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., LI, S., JIAN, M., ZHOU, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORÉ, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN,**



- K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., BORK, P., EHRLICH, S. D., WANG, J., ANTOLIN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H., BORRUEL, N., BRULS, T., CASELLAS, F., CHERVAUX, C., CULTRONE, A., DELORME, C., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FORTE, M., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KLEEREBEZEM, M., KNOL, J., KRISTENSEN, M., LAYEC, S., LE ROUX, K., LECLERC, M., MAGUIN, E., MELO MINARDI, R., OOZEER, R., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., TIMS, S., TORREJON, T., VARELA, E., DE VOS, W., WINOGRADSKY, Y. & ZOETENDAL, E. (2010).** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), 59-65.
- RAGA-CARBAJAL, E., CARRILLO-NAVA, E., COSTAS, M., PORRAS-DOMINGUEZ, J., LÓPEZ-MUNGUÍA, A., & OLVERA, C. (2016).** Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, 26(4), 377-385.
- 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. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- RATHSAM, C., & JACQUES, N. A. (1998).** Role of C-Terminal Domains in Surface Attachment of the Fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Journal of bacteriology*, 180(23), 6400-6403.
- REICHSTEIN, T., & GRÜSSNER, A. (1934).** Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helvetica Chimica Acta*, 17(1), 311-328.
- REID, G., GAUDIER, E., GUARNER, F., HUFFNAGLE, G. B., MACKLAIM, J. M., MUNOZ, A. M., MARTINI, M., RINGEL-KULKA, T., SARTOR, B. R., UNAL, R. R., VERBEKE, K. & WALTER, J. (2010).** Responders and non-responders to probiotic interventions: how can we improve the odds?. *Gut Microbes*, 1:3, 200-204.
- REID, G., YOUNES, J. A., VAN DER MEI, H. C., GLOOR, G. B., KNIGHT, R., & BUSSCHER, H. J. (2011).** Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 9(1), 27-38.
- RICHHARDT, J., BRINGER, S., & BOTT, M. (2013).** Role of the pentose phosphate pathway and the Entner–Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(10), 4315-4323.
- RINGQUIST, S., SHINEDLING, S., BARRICK, D., GREEN, L., BINKLEY, J., STORMO, G. D., & GOLD, L. (1992).** Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Molecular microbiology*, 6(9), 1219-1229.

- RITSEMA, T., & SMEEKENS, S. (2003).** Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 223-230.
- RIVIÈRE, A., SELAK, M., LANTIN, D., LEROY, F., & DE VUYST, L. (2016).** Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 979.
- ROBERFROID, M. (1993).** Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(2), 103-148.
- ROBERFROID, M., GIBSON, G. R., HOYLES, L., MCCARTNEY, A. L., RASTALL, R., ROWLAND, I., WOLVERS, D., WATZL, B., SZAJEWSKA, H., STAHL, B., GUARNER, F., RESPONDEK, F., WHELAN, K., COXAM, V., DAVICCO, M. J., LÉOTOING, L., WITTRANT, Y., DELZENNE, N. M., CANI, P. D., NEYRINCK, M. & MEHEUST, A. (2010).** Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1-S63.
- ROBERFROID, M. B., VAN LOO, J. A., & GIBSON, G. R. (1998).** The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of nutrition*, 128(1), 11-19.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R., JIMÉNEZ-DÍAZ, I., ZAFRA-GÓMEZ, A., & MORALES, J. C. (2015).** Improved sample treatment for the determination of fructooligosaccharides in milk related products by liquid chromatography with electrochemical and refractive index detection. *Talanta*, 144, 883-889.
- ROLLIN, J. A., TAM, T. K., & ZHANG, Y. H. P. (2013).** New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing. *Green chemistry*, 15(7), 1708-1719.
- 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. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6150-6158.
- SAENGTHONGPINIT, W., & SAJJAANANTAKUL, T. (2005).** Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) tubers. *Postharvest biology and Technology*, 37(1), 93-100.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- SAITO, K., GOTO, H., YOKOTA, A., & TOMITA, F. (1997).** Purification of Levan Fructotransferase from *Arthrobacter nicotinovoram* GS-9 and Production of DFA IV from Levan by the Enzyme. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(10), 1705-1709.

- SAITO, K., KONDO, K., KOJIMA, I., YOKOTA, A., & TOMITA, F. (2000).** Purification and Characterization of 2,6- $\beta$ -D-Fructan 6-Levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *Applied and environmental microbiology*, 66(1), 252-256.
- SALAZAR, N., RUAS-MADIEDO, P., KOLIDA, S., COLLINS, M., RASTALL, R., GIBSON, G., & CLARA, G. (2009).** Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *International journal of food microbiology*, 135(3), 260-267.
- SALIS, H. M., MIRSKY, E. A., & VOIGT, C. A. (2009).** Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nature biotechnology*, 27(10), 946-950.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- SANDERS, M. E., MERENSTEIN, D. J., REID, G., GIBSON, G. R., & RASTALL, R. A. (2019).** Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 605-616.
- SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N., & PRAPULLA, S. G. (2005).** Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in food science & technology*, 16(10), 442-457.
- SANTOS-MORIANO, P., FERNANDEZ-ARROJO, L., POVEDA, A., JIMENEZ-BARBERO, J., BALLESTEROS, A. O., & PLOU, F. J. (2015).** Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 119, 18-25.
- SARGENT, F., BERKS, B. C., & PALMER, T. (2006).** Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS microbiology letters*, 254(2), 198-207.
- SARILMISER, H. K., ATES, O., OZDEMIR, G., ARGAS, K. Y., & ONER, E. T. (2015).** Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(4), 455-463.
- SCHEDEL, M. (2000).** Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, key reaction in the industrial 1-deoxynojirimycin synthesis. *Biotechnology*, 8, 295-308.
- SCHMIDT, J., JOHN, M., & WANDREY, C. (1981).** Rapid separation of malto-, xylo- and cello-oligosaccharides (DP 2-9) on cation-exchange resin using water as eluent. *Journal of Chromatography A*, 213(1), 151-155.

- SCHREZENMEIR, J., & DE VRESE, M. (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 361s-364s.
- SCHÜNEMANN, H., HILL, S., GUYATT, G., AKL, E. A., & AHMED, F. (2011).** The GRADE approach and Bradford Hill's criteria for causation. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 65(5), 392-395.
- SCOBELL, H. D., & BROBST, K. M. (1981).** Rapid high-resolution separation of oligosaccharides on silver form cation-exchange resins. *Journal of Chromatography A*, 212(1), 51-64.
- SCOTT, K. P., GRIMALDI, R., CUNNINGHAM, M., SARBINI, S. R., WIJEYASEKERA, A., TANG, M. L., LEE, J. C. Y., YAU, Y. F., ANSELL, J., THEIS, S., YANG, K., MENON, R., ARFSTEN, J., MANURUNG, S., GOURINENI, V. & GIBSON, G. R. (2020).** Developments in understanding and applying prebiotics in research and practice—an ISAPP conference paper. *Journal of applied microbiology*, 128(4), 934-949.
- SEMJONOV, P., SHAKIROVA, L., TREIMANE, R., SHVIRKSTS, K., AUZINA, L., CLEENWERCK, I., & ZIKMANIS, P. (2016).** Production of extracellular fructans by *Gluconobacter naphelii* P1464. *Letters in applied microbiology*, 62(2), 145-152.
- SEZER, A. D., KAZAK SARILMIŞER, H., RAYAMAN, E., ÇEVİKBAŞ, A., ÖNER, E. T., & AKBUĞA, J. (2017).** Development and characterization of vancomycin-loaded levan-based microparticulate system for drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(5), 627-634.
- SHIH, L., CHEN, L. D., WANG, T. C., WU, J. Y., & LIAW, K. S. (2010).** Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chemistry*, 12(7), 1242-1247.
- SHIRYAEV, S. A., REMACLE, A. G., CHERNOV, A. V., GOLUBKOV, V. S., MOTAMEDCHABOKI, K., MURANAKA, N., DAMBACHER, C. M., CAPEK, P., KUKREJA, M., KOZLOV, I. A., PERUCHO, M., CIEPLAK, P. & STRONGIN, A. Y. (2013).** Substrate cleavage profiling suggests a distinct function of *Bacteroides fragilis* metalloproteinases (fragilysin and metalloproteinase II) at the microbiome-inflammation-cancer interface. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34956-34967.
- SIEMEN, A., KOSCIOW, K., SCHWEIGER, P., & DEPPENMEIER, U. (2018).** Production of 5-ketofructose from fructose or sucrose using genetically modified *Gluconobacter oxydans* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(4), 1699-1710.
- SONG, K. B., BAE, K. S., LEE, Y. B., LEE, K. Y., & RHEE, S. K. (2000).** Characteristics of levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 and difructose anhydride IV formation from levan. *Enzyme and microbial technology*, 27(3-5), 212-218.

- SRIKANTH, R., REDDY, C. H. S., SIDDARTHA, G., RAMAIAH, M. J., & UPPULURI, K. B. (2015A).** Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate polymers*, 120, 102-114.
- SRIKANTH, R., SIDDARTHA, G., REDDY, C. H. S., HARISH, B. S., RAMAIAH, M. J., & UPPULURI, K. B. (2015B).** Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate polymers*, 123, 8-16.
- STIVALA, S. S., BAHARY, W. S., LONG, L. W., EHRLICH, J., & NEWBRUN, E. (1975).** Levans. II. Light-scattering and sedimentation data of *Streptococcus salivarius* levan in water. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14(6), 1283-1292.
- TAJIMA, K., UENISHI, N., FUJIWARA, M., ERATA, T., MUNEKATA, M., & TAKAI, M. (1997).** The production of a new water-soluble polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005 and its structural analysis by NMR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 305(1), 117-122.
- TAMANAI-SHACOORI, Z., SMIDA, I., BOUSARGHIN, L., LOREAL, O., MEURIC, V., FONG, S. B., BONNAURE-MALLET, M. & JOLIVET-GOUGEON, A. (2017).** *Roseburia* spp.: a marker of health?. *Future microbiology*, 12(2), 157-170.
- TANAKA, H., ZHOU, X., & MASAYOSHI, O. (2003).** Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 987(1-2), 119-125.
- TANAKA, K., YAMAGUCHI, F., & KUSUI, S. (1989).** Action of levan fructotransferase of *Arthrobacter ureafaciens* on levan and phlein. *Agricultural and biological chemistry*, 53(5), 1203-1211.
- TANAKA, R., TAKAYAMA, H., MOROTOMI, M., KUROSHIMA, T., UEYAMA, S., MATSUMOTO, K., KURODA, A. & MUTAI, M. (1983).** Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria and microflora*, 2(1), 17-24.
- TANAKA, T., OI, S., & YAMAMOTO, T. (1980).** The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *The Journal of Biochemistry*, 87(1), 297-303.
- THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM (2012).** Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *nature*, 486(7402), 207.
- TIAN, F., & KARBOUNE, S. (2012).** Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 71-79.
- TIBONI, M., GRZYBOWSKI, A., PASSOS, M., BARISON, A., LIAO, L. M., CAMPOS, F. R., PONTAROLO, R. & FONTANA, J. D. (2012).** The use of dyed bacterial cellulose to monitor cellulase complex activity. *Cellulose*, 19(6), 1867-1877.



- VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M. L., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CRUZ-VÁZQUEZ, F., TREJO-CONTRERAS, M. J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BRAVO-PATIÑO, A., CAJERO-JUÁREZ, M., CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M. P. & VALDEZ-ALARCON, J. J. (2011). *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Archives of microbiology*, 193(2), 137-149.
- VELLANOWETH, R. L., & RABINOWITZ, J. C. (1992). The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Molecular microbiology*, 6(9), 1105-1114.
- WANG, B., FENG, H., EZEJI, T., & BLASCHEK, H. (2008). Sugaring-out separation of acetonitrile from its aqueous solution. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 31(12), 1869-1874.
- WANG, S., PAN, J., ZHANG, Z., & YAN, X. (2020). Investigation of dietary fructooligosaccharides from different production methods: Interpreting the impact of compositions on probiotic metabolism and growth. *Journal of Functional Foods*, 69, 103955.
- WANG, Y., HUANG, W., SATHITSUKSANO, N., ZHU, Z., & ZHANG, Y. H. P. (2011). Biohydrogenation from biomass sugar mediated by in vitro synthetic enzymatic pathways. *Chemistry & biology*, 18(3), 372-380.
- WILLIAMS, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449-458.
- WU, G. D., CHEN, J., HOFFMANN, C., BITTINGER, K., CHEN, Y. Y., KEILBAUGH, S. A., BEWTRA, M., KNIGHTS, D., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., SINHA, R., GILROY, E., GUPTA, K., BALDASSANO, R., NESSEL, L., LI, H., BUSHMAN, F. D. & LEWIS, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.
- XU, W., NI, D., ZHANG, W., GUANG, C., ZHANG, T., & MU, W. (2019). Recent advances in Levansucrase and Inulosucrase: evolution, characteristics, and application. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(22), 3630-3647.
- XU, W., PENG, J., NI, D., ZHANG, W., WU, H., & MU, W. (2020). Preparation, characterization and application of levan/montmorillonite biocomposite and levan/BSA nanoparticle. *Carbohydrate Polymers*, 234, 115921.
- YAMAMOTO, S., IIZUKA, M., TANAKA, T., & YAMAMOTO, T. (1985). The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Agricultural and biological chemistry*, 49(2), 343-349.
- YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, Y., KAWANO, M., IIZUKA, M., MATSUMOTO, T., SAEKI, S., & YAMAGUCHI, H. (1999). In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(1), 13-18.

- YE, X., WANG, Y., HOPKINS, R. C., ADAMS, M. W., EVANS, B. R., MIELENZ, J. R., & ZHANG, Y. H. P. (2009).** Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials*, 2(2), 149-152.
- ZAHID, N., & DEPPENMEIER, U. (2016).** Role of mannitol dehydrogenases in osmoprotection of *Gluconobacter oxydans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(23), 9967-9978.
- ZAHID, N., SCHWEIGER, P., GALINSKI, E., & DEPPENMEIER, U. (2015).** Identification of mannitol as compatible solute in *Gluconobacter oxydans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(13), 5511-5521.
- ZAMBELLI, P., FERNANDEZ-ARROJO, L., ROMANO, D., SANTOS-MORIANO, P., GIMENO-PEREZ, M., POVEDA, A., GANDOLFI, R., FERNÁNDEZ-LOBATO, M., MOLINARI, F. & PLOU, F. J. (2014).** Production of fructooligosaccharides by mycelium-bound transfructosylation activity present in *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium sizovae*. *Process Biochemistry*, 49(12), 2174-2180.
- ZEISER, J., MÜHLENBECK, L. H., SCHWEIGER, P., & DEPPENMEIER, U. (2014).** Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(5), 2067-2079.
- ZEYBEK, N., RASTALL, R. A., & BÜYÜKKILECI, A. O. (2020).** Utilization of xylan-type polysaccharides in co-culture fermentations of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* species. *Carbohydrate Polymers*, 116076.
- ZHAI, Q., FENG, S., ARJAN, N., & CHEN, W. (2019).** A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(19), 3227-3236.
- ZHANG, T., LI, R., QIAN, H., MU, W., MIAO, M., & JIANG, B. (2014).** Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydrate polymers*, 101, 975-981.
- ZHANG, W., XU, W., NI, D., DAI, Q., GUANG, C., ZHANG, T., & MU, W. (2019).** An overview of levan-degrading enzyme from microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(19), 7891-7902.



## 7. Danksagung

Drei Jahre Promotion sind eine sehr lange Zeit, in der man extrem viel über sein Promotionsthema, die Wissenschaft, die Universitätslandschaft, das Arbeitsumfeld, Kollegen, Freunde und vor allem über sich selbst lernt. Und meine Erfahrungen in diesen drei Jahren haben mir gezeigt, dass an dem Gelingen einer Doktorarbeit zahlreiche Menschen Anteil haben und diesen Menschen möchte ich hier danken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Vergabe des sehr spannenden und vielversprechenden Promotionsthemas bedanken. In zahlreichen, sehr intensiven Diskussionen haben Sie dazu beigetragen, meine wissenschaftliche Überzeugung zu festigen, und mich angespornt, etablierte Sichtweisen in der Wissenschaft kritisch zu hinterfragen. Des weiteren ziehe ich den Hut davor, dass Prof. Deppenmeier über lange Zeit, in der das Institut zahlreichen Veränderungen (Wechsel des Institutsdirektor, Asbest-Sanierung, Decken-Sanierung, Quecksilber-Sanierung, Einschränkungen bedingt durch das Corona-Virus) gegenüberstand, jegliche ihm zur Verfügung stehende Energie darauf verwendet hat, den Betrieb des Instituts aufrechtzuerhalten. Dafür vielen Dank!

Frau PD Dr. Christiane Dahl danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für den unermüdlichen Einsatz für das Institut und den Masterstudiengang Mikrobiologie. Vielen Dank auch für den angenehmen Umgang und die konstruktiven Gespräche in den letzten Jahren, vor allem im Zuge der Sonderfinanzierten Institutsbeschaffungen.

Ein weiteres Dankeschön gilt Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Anne-Katrin Mahlein für die Übernahme des fachnahen und fachfremden Korreferats.

Dr. Frank Jakob vom Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München danke ich für die Molekulargewichtsbestimmungen und die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen meiner ersten Publikation.

Dr. Stefan Kehraus aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie danke ich für die Anfertigung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.

Ein herzliches Dankeschön an Marlene Hecker für die Anfertigung der in dieser Arbeit abgebildeten FTIR-Spektren.

Kommen wir zur AG Deppenmeier, deren Mitglieder in den vergangenen vier Jahren (wenn man die Masterarbeit dazuzählt) zu wichtigen Weggefährten und Freunden geworden sind. Beginnen möchte ich hier mit den TA's der Arbeitsgruppe, Elisabeth Schwab und Natalie Thum-Schmitz. Sollte ich jemals in die sehr unwahrscheinliche Lage geraten, irgendwo eine tickende Bombe vorzufinden, für deren Entschärfung ich die Hilfe eines möglichst ruhigen und besonnenen Menschen benötige, würde meine Wahl definitiv auf Elisabeth Schwab fallen. Vielen Dank dafür, dass du mit deiner positiven Art und Hilfsbereitschaft die Arbeit im Institut extrem erleichterst. Natalie, dir vielen Dank für dein Organisationstalent und dafür, dass du in der „Quick & Dirty“-Arbeitsgruppe dafür sorgst, dass es nicht

allzu „Dirty“ wird. Allen Studenten, die ich in meiner Promotion betreuen durfte, danke ich dafür, dass ihr mein wissenschaftliches Interesse immer neu entfacht habt und mir sowohl auf menschlicher als auch auf wissenschaftlicher Ebene die Betreuung sehr leicht gemacht habt.

Bei den aktuellen und ehemaligen Doktoranden der AG Deppenmeier, mit denen ich in den vergangenen Jahren das Vergnügen hatte, danke ich für die tolle Zusammenarbeit und für die unermüdliche Leistung die Ihr für die Arbeitsgruppe und das Institut erbracht habt. Bedingt durch die Sanierungsarbeiten im Institut und die Einschränkungen durch das Corona-Virus verlief unsere Arbeit über einen langen Zeitraum unter erschwerten Arbeitsbedingungen. Es ist nicht selbstverständlich, dass Wir die Lehre und den Betrieb am Institut unter solchen Gegebenheiten in dieser Quantität und Qualität gewährleistet haben. Dafür möchte ich mich bei Konrad, Thomas, Juliane, Jacqueline, Laura, Fabian, Rebecca, Andre und Franzi ganz herzlich bedanken und grundsätzlich den Hut davor ziehen, mit welcher Intensität Ihr alle eurer Arbeit nachgeht.

Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Konrad und Thomas. Ihr wart in den vergangenen Jahren besonders auf der Arbeit aber auch im Privaten immens wichtige Weggefährten für mich und ich hoffe, dass sich unsere Wege noch häufig kreuzen werden.

Zu meiner Promotion in besonderem Maße beigetragen haben zahlreiche Freunde, die mir in meiner Freizeit dabei geholfen haben, den Kopf freizubekommen, sei es beim Bouldern, beim Stockbrot backen am Rhein oder beim Balkonieren in der Röckumstraße. Ganz nach dem Motto „Mit stumpfer Axt hackt es sich schlecht“ habt ihr mir dabei geholfen, in wichtigen Phasen der Regeneration meine psychische und physische Axt zu schärfen. Besonderer Dank daher an das ganze „Schafott“ (besonders an Arik), die Bewohner der Röckumstraße (Lukas, Jonas, Simon & Thorsten) sämtliche Leute, die mir die Zeit im Boulders Habitat versüßt haben (besonders Domme, Dominik & Wanda), meine Mitbewohnerin Stella und ihre Mädelsgruppe und alle Menschen, die mir in der Promotion zur Seite standen.

Zu guter Letzt, möchte ich mich natürlich bei meiner Familie bedanken, die es mir erst ermöglicht hat, diesen Weg zu gehen und daher riesigen Anteil an dieser Arbeit hat. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid und Verständnis hattet, wenn ich immer seltener die Zeit gefunden habe, Zeit mit euch zu verbringen.

## 8. Publikationsliste

### Veröffentlichungen

**Hövels, M., Kosciow, K. & Deppenmeier, U.\* (2020).** Characterization of a novel endo-levanase from *Azotobacter chroococcum* DSM 2286 and its application for the production of prebiotic fructooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*.

**Hövels, M., Kosciow, K., Kniewel, J. & Deppenmeier, U.\* (2020).** High yield production of levan-type Fruktans by *Gluconobacter japonicus* LMG 1417. *International Journal of Biological Macromolecules*.

**Deppenmeier, U., Hövels, M. & Kosciow, K. (2020).** Enzymatic production of levan-based, prebiotic Fructooligosaccharides. *Europäisches Patentregister* (PCT/EP2020/067447).

**Hoffmann, J. J., Hövels, M., Kosciow, K. & Deppenmeier, U.\* (2019).** Synthesis of the alternative sweetener 5-ketoFruktose from sucrose by Fruktose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains. *Journal of biotechnology*.

### Vorträge

**Hövels, M., Kniewel, J. & Deppenmeier, U. (2019).** *Gluconobacter japonicus*: a promising platform for the large-scale production of levan-based fructans. VAAM Jahrestagung 2019, Mainz.

### Poster

**Hövels, M., Kniewel, J. & Deppenmeier, U. (2018).** Microbial production of levan-based prebiotics. 5. Internationale Konferenz über Essigsäurebakterien 2018, Freising.

**Hövels, M. & Deppenmeier, U. (2018).** Production of levan-based prebiotics in *Gluconobacter* sp. VAAM Jahrestagung 2018, Wolfsburg.