

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

## **Entwicklung neuer Ganzzellbiokatalysatoren mit Essigsäurebakterien**

Simone Sofie Waltraud Bode

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfer der Dissertation 1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

2. Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 25.01.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 12.04.2021 angenommen.



*Für meine Eltern.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>II Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Essigsäurebakterien und ihre Verwendung in industriellen Prozessen .....	5
1.2 Die Gattung <i>Gluconobacter</i> .....	9
1.3 Membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien .....	11
1.4 Expressions- und Deletionssysteme für <i>G. oxydans</i> .....	13
1.5 Zielsetzungen der Arbeit .....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Verwendete Materialien und Enzyme .....	17
2.2 Molekularbiologische Arbeiten .....	17
2.2.1 Isolation von DNA .....	17
2.2.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrollen .....	18
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	18
2.2.4 Sequenzierung .....	19
2.2.5 Polymerase Kettenreaktion .....	19
2.2.5.1 Präparative PCR .....	20
2.2.5.2 Analytische PCR .....	21
2.2.6 Mutagenese von DNA Sequenzen .....	22
2.2.7 Restriktionsverdau .....	24
2.2.8 Ligation mit SLiCE-Klonierungsmethode .....	25
2.3 Mikrobiologische Arbeiten .....	26
2.3.1 Organismen und Plasmide .....	26
2.3.2 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung .....	35
2.3.2.1 Medien und Medienzusätze .....	35
2.3.2.2 Kultivierungsbedingungen .....	36
2.3.2.3 Bestimmung der optischen Dichte .....	37
2.3.2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle .....	37

2.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	38
2.3.4	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation .....	39
2.3.5	Konjugation von <i>G. oxydans</i> 621H.....	40
2.3.6	Markerfreie Insertionen in <i>G. oxydans</i> 621H mittels des <i>codBA</i> -Systems .....	41
2.3.7	Vorbereitung ruhender Zellen von Essigsäurebakterien.....	43
2.3.8	Biotransformationen mit ruhenden Zellen .....	43
<b>2.4</b>	<b>Analytik.....</b>	<b>44</b>
2.4.1	Ganzzell-DCPIP-Assay zur Aktivitätsbestimmung von membranständigen Dehydrogenasen .....	44
2.4.2	Modifizierter Seliwanoff-Test zum spezifischen Nachweis von Ketohexosen .....	44
2.4.3	HPLC Analyse .....	45
2.4.4	NMR-Spektroskopie .....	46
2.4.5	Bestimmung der Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> .....	46
2.4.5.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in Flüssigkulturen.....	46
2.4.5.2	Plattendiffusionstest .....	47
<b>2.5</b>	<b><i>In silico</i> Methoden.....</b>	<b>48</b>
2.5.1	Identifizierung von membranständigen Dehydrogenasen .....	48
2.5.2	Sequenzanalysen und -alignments .....	49
2.5.3	Proteinstruktur-Modellierung membranständiger Dehydrogenasen.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Stammsammlungsscreening zur Charakterisierung des Oxidationspotenzials membranständiger Dehydrogenasen.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen im Multideletionsstamm <i>G. oxydans</i> 621H BP.9.....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Charakterisierung von Polyol Dehydrogenasen.....	54
3.2.2	Charakterisierung membranständiger Glucose Dehydrogenasen .....	58
3.2.3	Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191... ..	62
3.2.4	Analyse der Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen durch NMR-Spektroskopie .....	65
<b>3.3</b>	<b>Stammentwicklung zur Produktion von L-Erythrose.....</b>	<b>67</b>
3.3.1	Oxidation von <i>meso</i> -Erythritol durch Polyol Dehydrogenasen .....	67
3.3.2	Promotoren aus <i>G. oxydans</i> zur Expression von Polyol Dehydrogenasen .....	69
3.3.3	Chromosomale Expression von Polyol Dehydrogenasen zur Herstellung von L-	

Erythrose.....	71
<b>3.4 Stammentwicklung zur Produktion von 5-Keto-D-Gluconat .....</b>	<b>75</b>
3.4.1 Charakterisierung der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat durch membranständige Glucose Dehydrogenasen .....	75
3.4.2 Charakterisierung der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat durch Polyol Dehydrogenasen .....	78
3.4.3 Kombinationen von membranständigen Glucose und Polyol-Dehydrogenasen zur Produktion von 5-Keto-D-Gluconat .....	83
<b>3.5 Entwicklung eines Screening-Verfahrens zum Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat.....</b>	<b>92</b>
<b>3.6 Studien zur Optimierung der Gluconat-Oxidation durch Polyol Dehydrogenasen.....</b>	<b>96</b>
3.6.1 Mutagenese der Polyol Dehydrogenase SldAB_621H zur Optimierung der Oxidation von D-Gluconat .....	97
3.6.1.1 Veränderung der Substratspezifität und des Substratspektrums durch gerichtete Mutagenese.....	97
3.6.1.2 Screening von zufällig mutagenisierten Polyol Dehydrogenasen .....	101
3.6.2 Screening der Stammsammlung auf 5-Ketogluconat-Produktion durch den modifizierten Seliwanoff-Test .....	105
<b>3.7 Oxidation von Antibiotika.....</b>	<b>107</b>
3.7.1 Charakterisierung der Oxidation von Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien.....	107
3.7.2 Auswirkungen der Oxidation auf die antibiotische Wirksamkeit gegenüber <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> .....	110
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>114</b>
<b>4.1 Screening der Aktivitäten der lehrstuhlinternen Stammsammlung in Ganzzell-DCPIP-Assays .....</b>	<b>114</b>
<b>4.2 Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien im Multideletionsstamm BP.9 .....</b>	<b>116</b>
4.2.1 Substratspektren von Polyol Dehydrogenasen.....	116
4.2.2 Substratspektren von membranständigen Glucose Dehydrogenasen.....	118
4.2.3 Membranständige Dehydrogenasen in <i>G. albidus</i> TMW2.1191 .....	119
4.2.4 Analyse der Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen durch NMR-Spektroskopie .....	121
<b>4.3 Produktion von L-Erythrose mit BP.9-Expressionsstämmen .....</b>	<b>123</b>
<b>4.4 Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose.....</b>	<b>126</b>

4.4.1 Katalyse der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat .....	127
4.4.2 Produktion von 5-Keto-D-Gluconat .....	128
<b>4.5 Screening-Verfahren für den spezifischen Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat.....</b>	<b>133</b>
<b>4.6 Optimierung der Gluconat-Oxidation durch Polyol Dehydrogenasen .....</b>	<b>135</b>
4.6.1 Gerichtete und ungerichtete Mutagenese mit Polyol Dehydrogenasen .....	135
4.6.2 5-Ketogluconat-Produktion der Stammsammlung im modifizierten Seliwanoff-Test	138
<b>4.7 Oxidation von Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen .....</b>	<b>140</b>
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>143</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>161</b>
<b>III Publikationen .....</b>	<b>178</b>
<b>IV Danksagung.....</b>	<b>179</b>
<b>V Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>180</b>

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2KG	2-Keto-D-Gluconat
452	Bezeichnung des ribosomalen Proteins L13
5KG	5-Keto-D-Gluconat
A.	<i>Acetobacter</i>
Am.	<i>Ameyamaea</i>
As.	<i>Asaia</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
BP.8	Multideletionsstamm von <i>G. oxydans</i> 621H, in dem die Gene von acht membranständigen Dehydrogenasen deletiert wurden, Expression der Polyol Dehydrogenase
BP.9	Multideletionsstamm von <i>G. oxydans</i> 621H, in dem die Gene von neun membranständigen Dehydrogenasen deletiert wurden
bzw.	Beziehungsweise
Cef	Cefoxitin
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtri-phosphate
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPmod	Modifiziertes Elektroporationsmedium
F	Farad
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FD	Fast Digest
G2DH	Membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase
g	Gramm
G.	<i>Gluconobacter</i>
Ga.	<i>Gluconacetobacter</i>

h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
K.	<i>Komagataeibacter</i>
k	Kilo; 10 <sup>3</sup>
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	„Lysogeny broth“
μ	Mikro; 10 <sup>-6</sup>
m	Milli; 10 <sup>-3</sup>
M	Molar (mol L <sup>-1</sup> ); beschreibt die Menge an Teilchen eines Stoffes in einer gegebenen Lösung
mADH	Membranständige Alkohol Dehydrogenase
mDH	Membranständige Dehydrogenase
mFDH	Membranständige Fructose Dehydrogenase
mFuDH	Membranständige Fucose Dehydrogenase
mGDH	Membranständige Glucose Dehydrogenase
MIC	Minimale Hemmkonzentration; niedrigste Konzentration einer Substanz, welche die Vermehrung eines Bakteriums inhibiert
mIDH	Membranständige Inositol Dehydrogenase
min	Minute
mLDH	Membranständige Lactat Dehydrogenase
mSDH	Membranständige Sorbitol Dehydrogenase
n	Nano; 10 <sup>-9</sup>
N.	<i>Neosaira</i>
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
Ω	Ohm; Einheit des elektrischen Widerstands
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
p	Piko, 10 <sup>-12</sup>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Wasserstoff-Ionen bzw. Hydronium-Ionen in einer wässrigen Lösung
PMS	Phenazinmethosulfat
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
Prom	Promotor

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
sekADH	Membranständige sekundäre Alkohol Dehydrogenase
SldAB	Polyol Dehydrogenase mit katalytischer Untereinheit SldA und kleiner Untereinheit SldB
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>T.</i>	<i>Tanticharoenia</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TufB	Elongationsfaktor Tu
UV	Ultraviolettstrahlung; Wellenlängenbereich von 100 nm bis 400 nm
V	Volt; Einheit der elektrischen Spannung
VM	Vollmedium
x g	Maßeinheit der relativen Zentrifugalkraft; wird als Vielfaches der Erdbeschleunigung (g = 9,81 m s <sup>-2</sup> ) angegeben
Y <sub>P/S</sub>	Spezifische Produktausbeute; beschreibt die Menge an gebildetem Produkt bezogen auf die Menge des zum Zeitpunkt t <sub>0</sub> eingesetzten Substrates
Y <sub>P(gesamt)/S</sub>	Spezifische Produktausbeute; beschreibt die Menge an allen nachfolgend gebildeten Produkten bezogen auf die Menge des zum Zeitpunkt t <sub>0</sub> eingesetzten Substrates
z. B.	zum Beispiel



# I Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer und hocheffizienter Ganzzellkatalysatoren für unvollständige Oxidationen mit membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien. Dazu wurden Gene für verschiedene membranständige Dehydrogenasen im Multideletionsstamm *Gluconobacter oxydans* 621H BP.9 exprimiert, dessen eigene Gene für alle bekannten membranständigen Dehydrogenasen deletiert worden waren. Durch die Abwesenheit eigener membranständiger Dehydrogenasen in Stamm BP.9 wurde eine genaue Charakterisierung einzelner membranständiger Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Essigsäurebakterien nach Expression der entsprechenden Gene in diesem Stamm möglich. Die Oxidationspotenziale und Substratspektren von insgesamt 13 membranständigen Dehydrogenasen aus *G. oxydans* 621H, *G. oxydans* DSM 3504, *G. albidus* TMW2.1191, *Ga. diazotrophicus* PAI5, *K. hansenii* LMG 1524 und *K. medellinensis* LMG 1693 wurden anhand von 43 Substraten beschrieben. Dabei wurden sechs Polyol Dehydrogenasen und sieben membranständige Glucose Dehydrogenasen in Bezug auf ihre Substratspektren verglichen. Polyol Dehydrogenasen oxidierten hauptsächlich sekundäre Alkohole, zyklische Alkohole, Zuckeralkohole und vereinzelt Aldosen und Ketosen. D-Gluconat wurde nur von der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H (SldAB\_621H) umgesetzt. Das Substratspektrum der Polyol Dehydrogenase 2 aus *G. oxydans* DSM 3504 (SldAB2\_3504) unterschied sich deutlich von bisher bekannten und auch den in dieser Arbeit charakterisierten Polyol Dehydrogenasen. Sie oxidierte neben (Zucker-)Alkoholen auch Aldosen und Disaccharide, die gewöhnlich von membranständigen Glucose Dehydrogenasen oxidiert werden. Zudem konnte erstmals die Oxidation von Aldoheptosen, Aldoheptosen und Ketoheptosen durch Polyol Dehydrogenasen gezeigt werden. In *G. albidus* TMW2.1191 wurden außerdem eine membranständige sekundäre Alkohol Dehydrogenase, die erst kürzlich beschrieben wurde, und eine noch unbekannte membranständige Fucose-Dehydrogenase identifiziert und nach Expression im Multideletionsstamm BP.9 unter Verwendung von Ganzzell-DCPIP-Assays charakterisiert. Zusätzlich wurde durch Biotransformation durch Zellen von BP.9 pMM4a-mSldAB und anschließender <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie 2-Hydroxy-Cyclohexanon als Oxidationsprodukt von *cis*-1,2-Cyclohexandiol identifiziert.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Expression membranständiger Polyol Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9 für die Produktion von L-Erythulose aus *meso*-Erythritol untersucht. Dazu wurden die Gene für die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H unter Kontrolle des *tufB*-Promotors plasmidkodiert in BP.9 pJV17 überexprimiert. Verglichen mit *G. oxydans* 621H pMM2 wurde mit diesem Stamm die Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythulose auf 160 % gesteigert. Bei chromosomaler Expression der Polyol Dehydrogenase-Gene unter der Kontrolle des *tufB*-Promotors im Multideletionsstamm BP.8 stieg die Erythulose-Ausbeute im Vergleich zu *G. oxydans* 621H auf 180 %. Bei der zweistufigen Oxidation von Glucose zu 5-Keto-D-Gluconat führte die Überexpression der membranständigen Glucose Dehydrogenasen in BP.9 zu einer deutlichen Steigerung der Glucose-

Oxidation. Die Ausbeute an D-Gluconat wurde bei alleiniger Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 (mGDH1\_3504) mit pMM3b in BP.9 im Vergleich zu *G. oxydans* 621H pMM2 auf 380 % erhöht. Die Expression der Gene der nativen membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H mit pMM3b in BP.9 erhöhte die Gluconat-Produktion auf 250 %. Bei chromosomaler Expression betrug die Steigerung maximal 36 %. Jedoch limitierte die Aktivität der Polyol Dehydrogenasen den zweiten Oxidationsschritt zu 5-Keto-D-Gluconat, was weitere Optimierungsexperimente erforderlich machte. Ein gezielter Austausch von nur zwei Aminosäuren in der katalytischen Untereinheit (SldA) von SldAB1\_3504 zeigte enorme Auswirkungen auf das Substratspektrum und die Oxidationsaktivität der Polyol Dehydrogenase. Die Mutation p.Leu179Ile in SldAB1\_3504 reichte dabei aus, um eine Aktivität gegenüber D-Gluconat zu erreichen. Zur weiteren Optimierung der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat wurde ein modifizierter Seliwanoff-Test entwickelt, der eine spezifische Unterscheidung von 2-Keto-D-Gluconat und 5-Keto-D-Gluconat ermöglichte und nicht sensitiv gegenüber dem Substrat D-Gluconat war. Der modifizierte Seliwanoff-Test wurde in Screenings von durch ungerichtete Mutagenese generierte Varianten der SldAB\_621H in einem Hochdurchsatz-Verfahren verwendet. Es konnte jedoch noch keine Zufallsmutante mit erhöhter Aktivität gegenüber D-Gluconat isoliert werden. Des Weiteren wurde der modifizierte Seliwanoff-Test für ein Screening der Stammsammlung von Essigsäurebakterien des Lehrstuhls für Mikrobiologie (TUM) genutzt, wodurch neue potenzielle membranständige Dehydrogenasen mit hohem Oxidationspotenzial gegenüber D-Gluconat gefunden wurden.

Zusätzlich wurden Antibiotika als weitere Substrate untersucht und dabei Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen gegenüber sechs Antibiotika durch ein Screening der lehrstuhlinterne Stammsammlung gezeigt. In *G. albidus* TMW2.1191 wurden daraufhin zwei membranständige Dehydrogenasen identifiziert, die Gentamicin, Kanamycin und Polymyxin B oxidierten. Auch eine potenzielle Auswirkung der Oxidation von Gentamicin durch membranständige Dehydrogenasen auf dessen antibiotische Wirkung wurde in Plattendiffusionstests mit den bakteriellen Teststämmen *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 gezeigt.

## II Summary

This work focused on the development of novel and highly efficient whole cell catalysts using incomplete oxidations by membrane-bound dehydrogenases from acetic acid bacteria. In this context, several membrane-bound dehydrogenases were expressed in the multideletion strain *G. oxydans* 621H BP.9, whose own genes for all known membrane-bound dehydrogenases had been deleted. The absence of own membrane-bound dehydrogenases in strain BP.9 enabled the detailed characterization of individual membrane-bound dehydrogenases from different acetic acid bacteria following their expression in this strain. The oxidative potential and substrate spectra of overall 13 membrane-bound dehydrogenases from five acetic acid bacteria were described for 43 substrates. The substrate spectra of six polyol dehydrogenases and seven membrane-bound glucose dehydrogenases from *G. oxydans* 621H, *G. oxydans* DSM 3504, *G. albidus* TMW2.1191, *Ga. diazotrophicus* PAI5, *K. hansenii* LMG 1524 and *K. medellinensis* LMG 1693 were compared with each other. Polyol dehydrogenases mainly oxidized secondary alcohols, cyclic alcohols and sugar alcohols and, to some extent, aldoses and ketoses. D-Gluconate was only oxidized by the polyol dehydrogenase from *G. oxydans* 621H (SldAB\_621H). The substrate spectrum of the polyol dehydrogenase 2 from *G. oxydans* DSM 3504 (SldAB2\_3504) differed greatly from other polyol dehydrogenases described so far. Besides secondary, cyclic and sugar alcohols, this enzyme also oxidized aldoses and disaccharides, which are usually oxidized by membrane-bound glucose dehydrogenases. Additionally, oxidation of aldohexoses, aldoheptoses and ketoheptoses by polyol dehydrogenases was demonstrated for the first time. Moreover, a membrane-bound secondary alcohol dehydrogenase, which was described only recently, and a yet unknown membrane-bound fucose dehydrogenase were identified in the genome of *G. albidus* TMW2.1191 and characterized upon expression in the multideletion strain BP.9 using whole-cell DCPIP assays. Additionally, 2-hydroxy cyclohexanone was identified as oxidation product of *cis*-1,2-cyclohexandiol by biotransformation with whole cells of BP.9 pMM4a-mSldAB and subsequent <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.

Also, the expression of different membrane-bound polyol dehydrogenases in the multideletion strain BP.9 for the production of L-erythrulose from *meso*-erythritol was studied. With overexpression of polyol dehydrogenase from *G. oxydans* 621H from expression plasmid pJV17 using the *tufB* promoter the oxidation of *meso*-erythritol to L-erythrulose was increased to 160 % compared to *G. oxydans* 621H pMM2. Upon chromosomal *tufB* promoter-driven expression of the same polyol dehydrogenase in multideletion strain BP.8 the erythrulose yield improved to 170 % in comparison to *G. oxydans* 621H. The result of overexpression of membrane-bound glucose dehydrogenase in BP.9 for the two-step oxidation of glucose to 5-keto-D-gluconate was a significant increase of glucose oxidation. Compared to *G. oxydans* 621H pMM2 the sole expression of membrane-bound glucose dehydrogenase 1 from *G. oxydans* DSM 3504 (mGDH1\_3504) encoded on pMM3b in BP.9 increased the gluconate yield to 380 %. Simultaneous expression of native membrane-bound glucose and polyol dehydrogenase of *G. oxydans* 621H using expression plasmid pMM3b improved gluconate production to 250 %. Using

chromosomal expression of native membrane-bound glucose and polyol dehydrogenase in multideletion strains of *G. oxydans* 621H gluconate production was increased up to 36 %. However, the activity of polyol dehydrogenases limited the second oxidation step from gluconate to 5-keto-D-gluconate, which required further optimization in subsequent studies. Replacement of only two amino acids in the catalytic unit (SldA) of SldAB1\_3504 revealed a considerable impact on the substrate spectra and the oxidative potential of the polyol dehydrogenase. It was shown that mutation p.Leu179Ile in SldAB1\_3504 was sufficient to gain activity towards D-gluconate. For further optimization of gluconate oxidation and 5-keto-D-gluconate production a modified Seliwanoff's test was developed, which specifically allowed the differentiation of 2-keto-D-gluconate and 5-keto-D-gluconate and was not reactive with the substrate D-gluconate. This test was used to examine variants of SldAB\_621H obtained by undirected mutagenesis in a high throughput screening setup. However, no random mutant of SldAB\_621H with increased activity against D-gluconate could be identified so far with this approach. Moreover, the modified Seliwanoff's test was applied to screen the strain collection of acetic acid bacteria of the Chair of Microbiology (TUM), leading to the identification of new potential membrane-bound dehydrogenases with high oxidative potential against D-gluconate.

Additionally, antibiotics were used as new substrates in whole cell DCPIP assays. Activity of membrane-bound dehydrogenases from our institute's strain collection of acetic acid bacteria was verified with six antibiotic substances. In *G. albidus* TMW2.1191 two membrane-bound dehydrogenases were found to be responsible for oxidative activity against gentamicin, kanamycin and polymyxin B. Also, potential consequence of the oxidation of gentamicin by membrane-bound dehydrogenases on its antibiotic effect was indicated with a disk diffusion test with *E. coli* K12 and *S. aureus* DSM 20232 as bacterial test strains.

# 1 Einleitung

## 1.1 Essigsäurebakterien und ihre Verwendung in industriellen Prozessen

Essigsäurebakterien sind stäbchenförmige, mesophile und Gram-negative Bakterien, die zur Familie der Acetobacteraceae aus der Klasse der  $\alpha$ -Proteobacteria gehören (Kersters et al. 2006; Raspor und Goranovic 2008). Die Zellen verschiedener Spezies können dabei beweglich oder auch unbeweglich sein, wobei motile Vertreter der Gattungen *Acetobacter* (*A.*) und *Gluconacetobacter* (*Ga.*) peritriche Flagellen und motile Arten von *Gluconobacter* (*G.*) polare Flagellen besitzen (Deppenmeier und Ehrenreich 2009; Mamlouk und Gullo 2013). Essigsäurebakterien sind strikt aerob mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor (Macauley et al. 2001; Mamlouk und Gullo 2013). Sie zeichnen sich in ihren besonderen Stoffwechsel durch die unvollständige Oxidation von verschiedensten Kohlenhydraten im Periplasma unter Erhalt ihres Kohlenstoffgerüsts, sowie einer hohen Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten und hoher Osmolarität aus (Raspor und Goranovic 2008; Mamlouk und Gullo 2013). Durch die Ansäuerung ihrer Umgebung aufgrund der schnellen unvollständigen Oxidationen und Abgabe der entstandenen Säuren in das umgebende Medium schaffen sie sich selektive Vorteile durch Hemmung des Wachstums anderer Mikroorganismen (Ehrenreich und Liebl 2017). Essigsäurebakterien sind vor allem durch die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure bekannt, die die Herstellung von Essig aus verschiedensten Quellen ermöglicht und die durch membranständige Dehydrogenasen im Periplasma katalysiert wird (Gullo et al. 2014). Einige Stämme wie *Komagataeibacter europaeus* tolerieren dabei eine Acetat-Konzentration bis zu 18 % (Ehrenreich und Liebl 2017). Es wurde vermutet, dass eine hohe Aktivität und Stabilität von membranständigen Alkohol Dehydrogenasen oder Transporter homolog zu *mutlidrug resistance*-Transportern in Zusammenhang mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Essigsäure stehen (Trcek et al. 2015). Allerdings wurden die genauen Mechanismen, die zu der Resistenz gegenüber Essigsäure führen noch nicht abschließend geklärt (Trcek et al. 2006; Ehrenreich und Liebl 2017).

Typische Habitats von Essigsäurebakterien sind je nach Gattung alkohol- oder zuckerreiche Umgebungen wie Früchte, Blüten, Säfte, der gastrointestinale Trakt von Honigbienen und fermentierte Produkte wie Wein, Essig, Kefir oder Sake (Gupta et al. 2001; de Muynck et al. 2007; Deppenmeier und Ehrenreich 2009). Sie treten daher auch als Verderber in Säften, Bier, Wein und anderen fermentierten Getränken auf (Raspor und Goranovic 2008; Mamlouk und Gullo 2013). Die bekanntesten Gattungen aus industriellen Anwendungen sind *Acetobacter* und *Gluconobacter*. *Acetobacter* bevorzugt alkoholreiche Umgebungen und wird vor allem für die Produktion von Essig eingesetzt (Ehrenreich und Liebl 2017); *Gluconobacter* besiedelt dagegen zuckerreiche Umgebungen, kann in hoch konzentrierten Zuckerlösungen wachsen, die bis zu 30 % D-Glucose enthalten können, und wird als Ganzzellkatalysator für verschiedene biotechnologische Anwendungen genutzt (Deppenmeier et al. 2002; Sievers und Swings 2005). In den letzten Jahren wurden immer wieder neue Essigsäurebakterien isoliert und bereits bekannte Spezies durch die Weiterentwicklung von Analysemethoden anderen

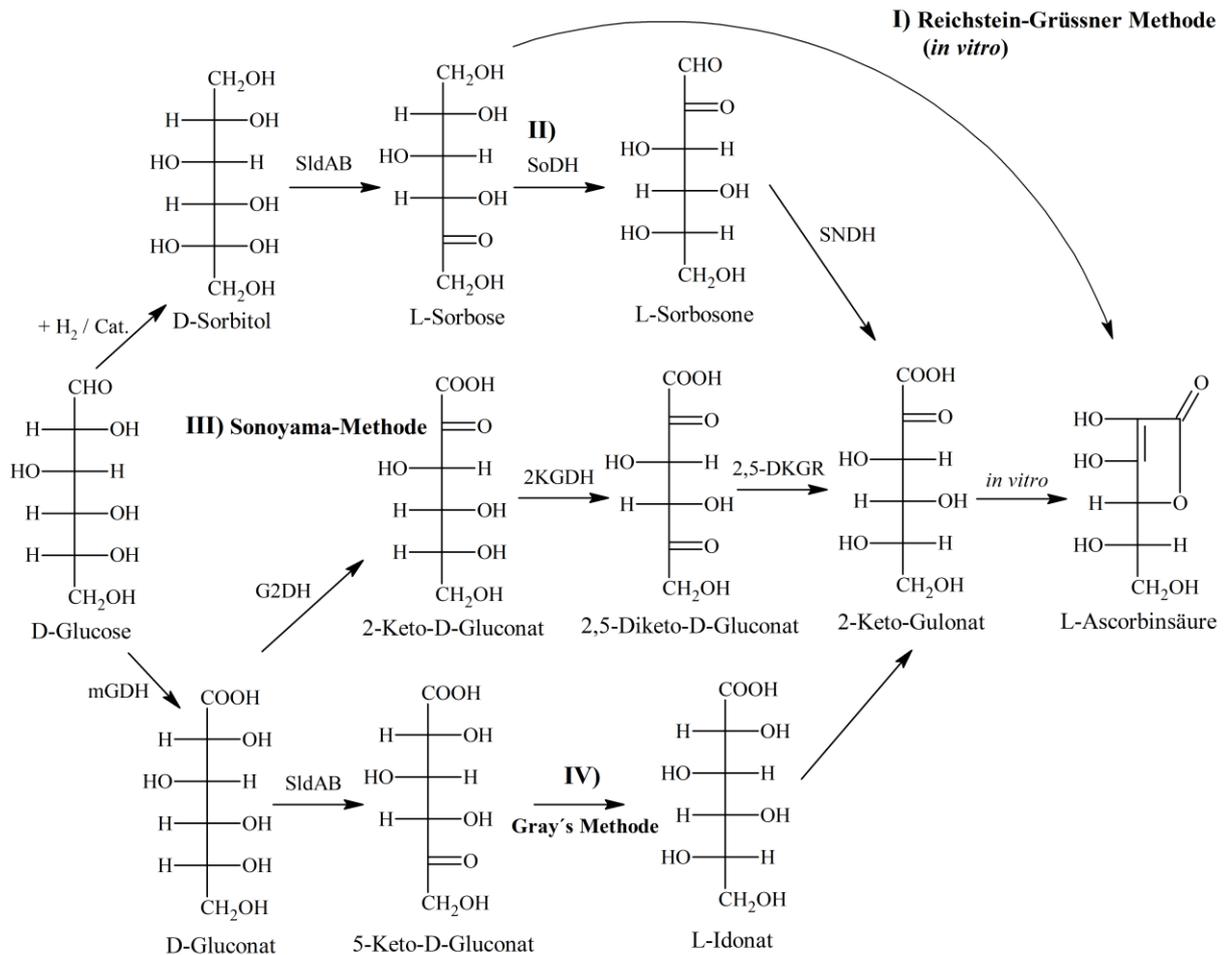
Gattungen und Spezies zugeordnet (Yamada et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2002; Vero und Giudici 2008; Yukphan et al. 2009; Yamada et al. 2013; Treck und Barja 2015). Bis jetzt wurden in der Familie der Acetobacteraceae 46 Genera definiert (aus <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, abgerufen am 06.01.2020). Darunter finden sich Stickstofffixierer wie *Ga. diazotrophicus*, die in Symbiose mit Pflanzen leben (Saravanan et al. 2008; Raspor und Goranovic 2008) und das opportunistisch humanpathogene Essigsäurebakterium *Granulibacter bethesdensis*, das aus Patienten mit chronischer Granulomatose isoliert wurde (Greenberg et al. 2006; Alauzet et al. 2010). Taxonomisch werden Essigsäurebakterien in die beiden Gruppen der Suboxidierer und Peroxidierer eingeteilt, die anhand ihres Stoffwechsels unterschieden werden: Peroxidierer wie *Acetobacter* Spezies können gebildetes Acetat und Lactat vollständig zu CO<sub>2</sub> abzubauen. Suboxidierer wie *Gluconobacter oxydans* haben diese Möglichkeit nicht, da bei diesen die Succinat-Dehydrogenase und die Succinyl-CoA Synthase für einen vollständigen Citratzyklus fehlt (Greenfield und Claus 1972; Olijve und Kok 1979).

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft von Essigsäurebakterien sind oxidative Fermentationen, bei denen verschiedenste Kohlenhydrate unter Erhalt des Kohlenstoffgerüsts unvollständig oxidiert und die korrespondierenden Produkte wie Aldehyde, Ketone oder organische Säuren in das umgebende Medium abgegeben werden (Mamlouk und Gullo 2013; Deppenmeier et al. 2002). Diese Oxidationen werden von meist PQQ- oder FAD-abhängigen membranständigen Dehydrogenasen katalysiert, die in der Cytoplasmamembran verankert sind und deren katalytisches Zentrum sich im Periplasma befindet (Deppenmeier et al. 2002). Durch die Lage dieser Enzyme können Substrate und deren Oxidationsprodukte ohne Limitierung durch Porine in das Periplasma bzw. in das umgebende Medium transportiert werden (Deppenmeier et al. 2002). Durch diesen Vorteil und dem breiten Substrat- und Produktspektrum der membranständigen Dehydrogenasen wurden wichtige biotechnologische Verfahren mit Essigsäurebakterien als Ganzzellkatalysatoren entwickelt, die umweltfreundlich und nachhaltig umgesetzt werden können und oft mit chemischen Synthesen nur schwer oder gar nicht realisierbar sind (Mamlouk und Gullo 2013). Neben der Herstellung von verschiedenen Essigsorten und fermentierten Getränken ist auch die Produktion der kalorienarmen Süßstoffe Tagatose oder 5-Ketofrurose in der Lebensmittelindustrie mit Hilfe von Essigsäurebakterien möglich (Manzoni et al. 2001; Hoffmann et al. 2020). Andere wichtige Produkte aus Fermentationen mit Essigsäurebakterien sind das Antidiabetikum Miglitol, bei dessen Herstellung die Oxidation von Aminosorbitol-Derivaten mit *G. oxydans* Zellen als zentraler Schritt gilt (Schedel 2000), sowie Dihydroxyaceton und L-Erythrose, die als Bestandteile von Selbstbräunern in der Kosmetikindustrie eingesetzt werden (Whistler und Underkofler 1938; Bories et al. 1991; Adachi et al. 2003).

Die Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose wurde erstmals durch Whistler und Underkofler (1938) beschrieben, welche durch eine membranständige Polyol Dehydrogenase, kodiert durch die Gene *sldA* und *sldB*, katalysiert wurde. Es wurde gezeigt, dass L-Erythrose im Vergleich zu Dihydroxyaceton als Bräunungsmittel eine bessere Verträglichkeit und eine gleichmäßigere Bräunung auf der Haut aufweist, wodurch das zunächst in Selbstbräunern verwendete Dihydroxyaceton immer

mehr durch L-Erythrose ersetzt wurde (Jermann et al. 2002). Daher beschäftigten sich in den letzten Jahren auch mehrere Studien mit Möglichkeiten, die Produktivität der Fermentation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose mit *G. oxydans* zu erhöhen und die Effektivität einer industriellen Herstellung zu verbessern. In einem Patent (DE102008006101A1) zur Produktion von L-Erythrose mit *G. oxydans* DSM 21030 wurde ein Zulaufverfahren beschrieben, bei dem in 147 h mit 92 % Ausbeute und einem vollständigen Umsatz eine Erythrose-Konzentration von 235 g L<sup>-1</sup> erreicht wurde (Vorlop et al. 2009). In einem Zulaufverfahren mit einem *G. kondonii* Stamm steigerten Pan et al. (2016) die Raumzeitausbeute verglichen mit Vorlop et al. um 300 % auf 6,5 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bei einer maximalen Produktkonzentration von 208 g L<sup>-1</sup> L-Erythrose. Burger et al. (2019) setzten den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H *Aupp* BP.8 für die Oxidation von *meso*-Erythritol ein, in dem – bis auf die für die Katalyse benötigte Polyol Dehydrogenase – alle bekannten membranständigen Dehydrogenasen deletiert wurden. In einem Satzverfahren konnte dadurch die maximale Produktkonzentration auf 242 g L<sup>-1</sup> erhöht werden, wobei eine Raumzeitausbeute von 10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erreicht wurde. In der gleichen Veröffentlichung wurde auch ein kontinuierliches Verfahren für die Herstellung von L-Erythrose mit dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H *Aupp* BP.8 beschrieben, durch welches die Raumzeitausbeute nochmals deutlich auf 27 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> gesteigert wurde. Auch die Herstellung von L-Erythrose aus  $\beta$ -Hydroxypyruvat und Glycolaldehyd mit rekombinant exprimierten und aufgereinigten Transketolasen aus *Escherichia (E.) coli* wurde untersucht, jedoch blieben die dort erreichten maximalen Produktkonzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten weit hinter denen mit *Gluconobacter* erreichten Werten zurück (Bongs et al. 1997; Vasic-Racki et al. 2003). Bisherige Studien zur *meso*-Erythritol-Oxidation mit *Gluconobacter* befassten sich jedoch vor allem mit verfahrenstechnischen Problemstellungen der Erythrose-Herstellung. Eine Optimierung der eingesetzten Stämme, beispielsweise durch gezielten Austausch der Polyol Dehydrogenase mit effizienteren membranständigen Dehydrogenasen oder Steigerung der Expression *sldAB*-Gene durch Verwendung ausgewählter Promotoren, wurde nicht vorgenommen.

Eines der wichtigsten biotechnologischen Verfahren mit *Gluconobacter* ist die Produktion von Ascorbinsäure-Vorläufern (Mamlouk und Gullo 2013). Für die Vitamin C-Herstellung wurden mehrere Syntheserouten beschrieben, die ausgehend von D-Glucose über verschiedene Zwischenprodukte verlaufen (Abbildung 1-1). Das Reichstein-Grüssner-Verfahren war das erste beschriebene Verfahren und beinhaltete die Oxidation von Sorbitol zu L-Sorbose mit einem anfangs aus einer Essigmutter isolierten Essigsäurebakterium (Reichstein und Grüssner 1934). Für ein zweites Verfahren wurde die von Reichstein und Grüssner etablierte *in vitro* Synthese durch Fermentationen mit *Gluconobacter* ersetzt. Dabei wurde L-Sorbose durch eine Sorbose Dehydrogenase und einer L-Sorboson Dehydrogenase über L-Sorboson zu 2-Keto-Gulonat oxidiert (Sugisawa et al. 1990; Sugisawa und Hoshino 2002). Bei der Sonoyama-Methode wurde ein Verfahren definiert, bei dem Stämme der Gattungen *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* oder *Gluconobacter* aus D-Glucose das Intermediat 2,5-Diketo-D-Gluconat herstellen, welches in einer folgenden Biotransformation mit Corynebakterien zu 2-



**Abbildung 1-1.** Chemische und biotechnologische Produktion von Ascorbinsäure. I) *in vitro* Reichstein-Grüssner Methode. II) Oxidation über L-Sorbose mit *Gluconobacter*. III) Sonoyama-Methode über 2-Keto-D-Gluconat und 2,5-Diketo-D-Gluconat mit *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, oder *Pantoea* Stämmen. IV) Gray's Methode über 5-Keto-D-Gluconat mit *Gluconobacter*. mGDH: membranständige Glucose Dehydrogenase, G2DH: Gluconat-2-Dehydrogenase, 2KGDH: 2-Ketogluconat Dehydrogenase, 2,5-DKGR: 2,5-Diketo-D-Gluconat Reduktase, SldAB: Polyol Dehydrogenase, SNDH: L-Sorboson Dehydrogenase, SoDH: Sorbose Dehydrogenase. Nach Adachi et al. (2003)

Keto-Gulonat reduziert wird (Sonoyama et al. 1982). Die bei diesen drei Verfahren entstehenden Intermediate L-Sorboson und 2,5-Diketo-D-Gluconat sind jedoch instabil, weshalb die Produktion der Ascorbinsäure nach der Gray-Methode über das stabilere 5-Keto-D-Gluconat bevorzugt verwendet werden sollte (Gray 1945; Adachi et al. 2003). Entscheidend ist hier die Oxidation der D-Glucose über D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat, welche durch die membranständige Glucose Dehydrogenase und Polyol Dehydrogenase in *Gluconobacter* katalysiert werden (Ameyama et al. 1981a; Matsushita et al. 2003). Ein weiteres wichtiges industrielles Produkt, das aus 5-Keto-D-Gluconat hergestellt werden kann, ist die L-(+)-Weinsäure, die in der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie beispielsweise als Säuerungs- und Konservierungsmittel, Antioxidans oder zur Ledergerbung eingesetzt wird und als

wichtiger Ausgangsstoff für eine Vielzahl von asymmetrischen Synthesen dient (Gawroński und Gawrońska 1999; Ghosh et al. 2001; Merfort 2006). Bei der traditionellen Gewinnung der Weinsäure aus Weinstein ist die Verfügbarkeit der Weinsäure aufgrund der Abhängigkeit von der Weinherstellung limitiert und die Qualität des Ausgangsstoffes variiert. Mit Vanadium als Katalysator kann 5-Keto-D-Gluconat in L-(+)-Weinsäure und Oxalsäure gespalten werden, wodurch L-(+)-Weinsäure mit gleichbleibender Qualität produziert werden kann (Klasen et al. 1992; Matzerath et al. 1995). Essigsäurebakterien bilden jedoch meist zeitgleich 2- und 5-Keto-D-Gluconat aus D-Gluconat aufgrund konkurrierender membranständiger Polyol und Gluconat-2-Dehydrogenasen (García-García et al. 2017). Um eine Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat ohne Bildung des Nebenprodukts 2-Keto-D-Gluconat mit Essigsäurebakterien zu ermöglichen, sollte die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase zunächst aus dem verwendeten Stamm deletiert werden (Elfari et al. 2005). Bisherige Studien produzierten 5-Keto-D-Gluconat durch Fermentation von *G. oxydans* mit D-Glucose als Substrat in Satzprozessen oder Zulaufverfahren (Merfort et al. 2006a; Yuan et al. 2016a, 2016b). Merfort et al. (2006a) erreichten mit dem Stamm *G. oxydans* MF1, der durch Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase und Überexpression der Polyol Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H entstand, eine Produktkonzentration von 57 g L<sup>-1</sup> 5-Keto-D-Gluconat. Yuan et al. (2016b) beschrieben die Produktion von 117,75 g L<sup>-1</sup> 5-Keto-D-Gluconat mit einer sekundären Alkohol Dehydrogenase (*gcd*) aus *Xanthomonas campestris* DSM 3586. Das *gcd*-Gen wurde in *G. oxydans* 621H überexprimiert, in dem zuvor ebenfalls die Gluconat-2-Dehydrogenase deletiert wurde. In einer zweiten Veröffentlichung modifizierten Yuan et al. (2016a) den Stamm *G. oxydans* 621H neben der Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase noch weiter und testeten zusätzlich eine zeitgleiche Überexpression der nativen *sldAB*-Gene, der Gene für die Synthese des Cofaktors Pyrrolochinolinchinon (PQQ) und der Bo3 Oxidase, wodurch sie die maximale 5-Ketogluconat-Konzentration auf 162 g L<sup>-1</sup> in 64 h steigerten.

## 1.2 Die Gattung *Gluconobacter*

Stämme der Gattung *Gluconobacter* werden, wie bereits erwähnt, aufgrund der Charakteristika des Genus vielseitig in biotechnologischen Verfahren eingesetzt (Macauley et al. 2001). Während Vertreter der Gattung *Acetobacter* vermehrt in alkoholreichen Umgebungen auftreten, bevorzugen *Gluconobacter* Stämme vor allem zuckerreiche Habitate wie Früchte und Blüten (de Muynck et al. 2007; Raspor und Goranovic 2008). Bisher wurden für die Gattung *Gluconobacter* 13 Spezies beschrieben (aus <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, abgerufen am 06.01.2020). *Gluconobacter oxydans* zählt durch seine Fähigkeit, verschiedenste Substrate wie Alkohole, Polyole, Zucker und Säuren unvollständig zu oxidieren, in hoch konzentrierten Zuckerlösungen und bei niedrigen pH-Werten zu wachsen, zu den am meisten genutzten Organismen für industrielle biotechnologische Verfahren (Sievers und Swings 2005; de Muynck et al. 2007). Die Sequenzierung des Genoms von

*G. oxydans* 621H durch Prust et al. (2005) ermöglichte ein genaueres Verständnis der Stoffwechselwege und der beteiligten Enzyme in *G. oxydans*.

Eine Besonderheit des Stoffwechsels von *G. oxydans* sind wie bei allen Essigsäurebakterien membranständige Dehydrogenasen, die in der Cytoplasmamembran verankert sind und ihr aktives Zentrum im Periplasma haben. Membranständige Dehydrogenasen oxidieren verschiedenste Substrate unvollständig, zu denen Alkohole, Polyole, Aldosen, Ketosen und Carbonsäuren zählen, und sind für einen großen Teil der Katalysen in den biotechnologischen Anwendungen mit *G. oxydans* verantwortlich. Durch die schnelle Oxidation im Periplasma wird ein großer Teil der vorhandenen Substrate von membranständigen Dehydrogenasen umgesetzt. Bei D-Glucose als Kohlenstoffquelle werden etwa 90 % der vorhandenen D-Glucose durch die membranständige Glucose Dehydrogenase oxidiert und nur 10 % der D-Glucose gelangen in den zentralen Stoffwechsel (Lu et al. 2012; Ostermann et al. 2015). Elektronen, die bei diesen Oxidationen im Periplasma entstehen, werden auf Ubichinon des Typs Q10 übertragen und über die Atmungskette an den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff weitergegeben (Deppenmeier et al. 2002; Deppenmeier und Ehrenreich 2009).

Membranständige Dehydrogenasen dienen im natürlichen Stoffwechsel hauptsächlich der Energiegewinnung und stehen hinsichtlich der Kapazität der Atmungskette in Konkurrenz mit den cytosolischen NADH-abhängigen Dehydrogenasen, die ebenfalls durch Oxidation von Polyolen und Zuckern Elektronen an die Atmungskette weiterleiten (Kostner et al. 2015). Eine hohe Aktivität der cytosolischen Dehydrogenasen wird mit erhöhten Wachstumsraten in Verbindung gebracht, da sie wichtige Stoffwechselintermediate bilden, die dem zentralen Stoffwechsel als Substrate dienen und so zum Aufbau von Biomasse und dem Erhaltungsstoffwechsel der stationären Wachstumsphase beitragen (Matsushita et al. 1994). Auch andere Komponenten des zentralen Stoffwechsels in *G. oxydans* wurden genauer untersucht. Der Zitronensäurezyklus ist in *G. oxydans* unvollständig und dient deshalb ausschließlich biosynthetischen Zwecken, da Gene für eine Succinat-Dehydrogenase und Succinyl-CoA Synthase fehlen (de Ley 1984). Auch die Gluconeogenese und die Glykolyse sind wegen der fehlenden Phosphoenolpyruvat-Synthase bzw. Phosphofruktokinase nicht funktionell (Raspor und Goranovic 2008; Hanke et al. 2013). Wichtige zentrale Stoffwechselwege in *G. oxydans* sind daher der Pentose-Phosphat-Weg und der Entner-Doudoroff-Weg, für die alle nötigen Gene annotiert sind (Prust et al. 2005). Der Pentose-Phosphat-Weg gilt als der bedeutendste Stoffwechselweg in *G. oxydans* und wird primär genutzt, um Zucker und Polyole zu verwerten (Macauley et al. 2001). Die Schlüsselenzyme des Pentose-Phosphat-Weges sind die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (Rauch et al. 2010). Die fehlende Glykolyse in *G. oxydans* limitiert außerdem die vorhandene Menge an NADH als Elektronendonator (Rauch et al. 2010). In *Gluconobacter* dient stattdessen der Pentose-Phosphat-Weg der Produktion von benötigtem NADPH (Hanke et al. 2013).

Die membranständigen Dehydrogenasen, die in Konkurrenz um Substrate mit den Enzymen des zentralen Stoffwechsels stehen, oxidieren mengenmäßig einen Großteil der vorhandenen Substrate. Die

korrespondieren Produkte wie Carbonsäuren werden in das Medium abgegeben, was zu einer Ansäuerung des umgebenden Mediums führt. Durch die hohe Toleranz von *Gluconobacter* gegenüber niedrigen pH-Werten entsteht ein Vorteil gegenüber anderen Mikroorganismen, die durch die Ansäuerung des Mediums in ihrem Wachstum inhibiert werden (Ehrenreich und Liebl 2017). Der Aufbau des zentralen Stoffwechsels in Kombination mit den schnellen Oxidationen im Periplasma stellt daher eine Anpassung an die substratreichen Habitate dar und erklärt die nur geringen Zelldichten, die von *G. oxydans* erreicht werden.

### 1.3 Membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien

Viele der etablierten biotechnologischen Verfahren mit Essigsäurebakterien werden durch unvollständige Oxidationen der Substrate im Periplasma realisiert. Verantwortlich für die Katalyse der Reaktionen sind die bereits erwähnten membranständigen Dehydrogenasen, die ihr aktives Zentrum im Periplasma besitzen und verschiedenste Substrate oxidieren. Die bei diesen Oxidationen entstehenden Elektronen werden über einen Ubichinon-Pool und eine terminale Oxidase an Sauerstoff weitergegeben und so wird ein Protonengradient erzeugt, durch den über eine ATP-Synthase Energie in Form von ATP gebildet wird (Schmid und Urlacher 2007; Hanke et al. 2013). Das Substratspektrum einer membranständigen Dehydrogenase kann nur einzelne oder auch etwa 30 Substrate über verschiedene Substratklassen umfassen (Peters et al. 2013; Peters et al. 2017; Mientus et al. 2017). Die Substrate und deren korrespondierende Produkte werden durch Porine in das Periplasma bzw. in das Medium transportiert und unterliegen somit keiner Transportlimitierung (Deppenmeier et al. 2002). Membranständige Dehydrogenasen besitzen entweder Pyrrolochinolinchinon (PQQ) oder Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als Cofaktoren, die beide eng an die Dehydrogenasen gebunden sind. Nur die Aldehyd Dehydrogenase bildet hier eine Ausnahme, die als Cofaktor Molybdopterin benötigt (Schmid und Urlacher 2007). Die Aktivitätsbestimmung der membranständigen Dehydrogenasen erfolgte in einigen Studien mit künstlichen Elektronenakzeptoren wie Kaliumhexacyanidoferrat (III) oder Phenazinmethosulfat (PMS) in Kombination mit 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP). Durch die Oxidation von Substraten mit membranständigen Dehydrogenasen entstehen Elektronen, die auf Kaliumhexacyanidoferrat (III) oder Phenazinmethosulfat übertragen werden. Das Kaliumhexacyanidoferrat (III) wird durch die Aufnahme der Elektronen zu Kaliumhexacyanidoferrat (II) reduziert. Dessen Bildung kann kolorimetrisch bei 660 nm verfolgt und daraus die Enzymaktivität anhand der Menge des oxidierten Substrats berechnet werden (Ameyama et al. 1981b). Auch der Assay mit PMS und DCPIP basiert auf einer photometrischen Messung (Izai et al. 1992; Salusjärvi et al. 2004). Die durch Oxidation von Substraten entstehenden Elektronen werden von PMS aufgenommen und auf DCPIP übertragen. Abhängig vom pH-Wert des Puffers wird die Reduktion des DCPIP bei verschiedenen Wellenlängen photometrisch verfolgt und mit der Aktivität der membranständigen

Dehydrogenasen korreliert. Die Charakterisierung von membranständigen Dehydrogenasen mit PMS und DCPIP bzw. Kaliumhexacyanidoferrat (III) erfolgte zunächst vor allem durch Solubilisierung der Enzyme aus der Cytoplasmamembran oder der Präparation der Membranfraktion (Adachi et al. 1978; Ameyama et al. 1981a; Shinagawa et al. 1982; Ameyama et al. 1985). Die Präparation der Membranfraktion bzw. die Isolierung und Aufreinigung der Enzyme ist jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv, was die Anzahl der bisher charakterisierten membranständigen Dehydrogenasen begrenzte. Erst später passte Peters et al. (2013) den Assay mit DCPIP und PMS so an, dass die Aktivität der membranständigen Dehydrogenasen auch mit ganzen Zellen gemessen werden konnte.

In Wildtypstämmen sind jeweils eine Reihe von membranständigen Dehydrogenasen vorhanden, deren Substratspektren sich teilweise überlappen und so eine vollständige Identifizierung der Substrate von membranständigen Dehydrogenasen erschweren. Dennoch wurden bisher einige membranständige Dehydrogenasen einzeln beschrieben und charakterisiert (Ameyama et al. 1981a, 1985; Moonmangmee et al. 2001; Sugisawa und Hoshino 2002; Sará-Páez et al. 2015). Die PQQ-abhängige membranständige Alkohol Dehydrogenase besitzt je nach Stamm zwischen zwei und drei Untereinheiten und oxidiert bevorzugt primäre Alkohole enantiospezifisch (Yakushi und Matsushita 2010). Für bereits charakterisierte membranständige Alkohol Dehydrogenasen wurden breite Substratspektren mit bis zu 28 Substraten beschrieben, die neben primären Alkoholen auch zyklische Alkohole, Aldehyde und vereinzelt Zuckeralkohole, Aldosen und Disaccharide einschließen (Adachi et al. 1978; Moonmangmee et al. 2001; Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017). Sie wurde vor allen durch die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd bekannt und ist damit mit der membranständigen Aldehyd Dehydrogenase für die Produktion von Essigsäure entscheidend (Gullo et al. 2014). Erst kürzlich wurde außerdem eine PQQ-abhängige membranständige sekundäre Alkohol Dehydrogenase im Metagenom einer Essigmutter identifiziert und charakterisiert, die nur eine Untereinheit besitzt und ausschließlich sekundäre Alkohole oxidiert (Peters et al. 2017). Die Aldehyd Dehydrogenase, die bei der Produktion von Essigsäure die zweite Reaktion von Acetaldehyd zu Acetat katalysiert, oxidiert Aldehyde zu ihren korrespondierenden Säuren und besitzt als einzige membranständige Dehydrogenase Molybdopterin als Koenzym (Adachi et al. 1980; Schmid und Urlacher 2007). Die PQQ-abhängige membranständige Glucose Dehydrogenase ist nach der für dieses Enzym typischen Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat benannt und besteht aus einer Untereinheit. Zunächst konnte durch Charakterisierung eines aufgereinigten Enzyms nur die Katalyse der Oxidation von D-Glucose und Maltose als Substrate für die membranständige Glucose Dehydrogenase identifiziert werden (Ameyama et al. 1981a). In späteren Studien wurden jedoch breitere Substratspektren von membranständigen Glucose Dehydrogenasen gemessen, die verschiedene Aldosen und Disaccharide umfassten (Peters et al. 2013; Sará-Páez et al. 2015; Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017). Das von der membranständigen Glucose Dehydrogenase (mGDH) produzierte D-Gluconat kann in Essigsäurebakterien durch zwei Enzyme im Periplasma weiter oxidiert werden, wobei das Verhältnis der entstehenden Produkte (2-Keto-D-Gluconat und 5-Keto-D-Gluconat) von Stamm zu Stamm variiert (Mamlouk und Gullo 2013). Eines dieser Enzyme ist die Gluconat-2-Dehydrogenase, die spezifisch die

Oxidation von D-Gluconat zu 2-Keto-D-Gluconat katalysiert (Mientus et al. 2017). Dieses kann anschließend durch einige Essigsäurebakterien mit einer FAD-abhängigen 2-Ketogluconat Dehydrogenase zu 2,5-Diketo-D-Gluconat umgesetzt werden (Kataoka et al. 2015). Alternativ wird D-Gluconat von der PQQ-abhängigen Polyol Dehydrogenase zu 5-Keto-D-Gluconat oxidiert (Matsushita et al. 2003). Die Polyol Dehydrogenase ist eine der am besten untersuchten membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien. Sie oxidiert Polyole gemäß der Bertrand-Hudson Regel in der D-Erythro-Konfiguration am C2-Atom zu einer Ketose (Kerstens et al. 1965). Polyol Dehydrogenasen besitzen eine große Untereinheit (SldA) mit dem katalytischen Zentrum und eine kleine Untereinheit (SldB), die die Dehydrogenase in der Cytoplasmamembran verankert und für die Aktivität der katalytischen Domäne benötigt wird (Shinjoh et al. 2002). Ähnlich wie membranständige Alkohol Dehydrogenasen weisen auch Polyol Dehydrogenasen breite Substratspektren auf und katalysieren die Oxidation von sekundären und zyklischen Alkoholen, Zuckeralkoholen, Aldosen, Ketosen und der Carbonsäure D-Gluconat (Lapenaite et al. 2005; Voss et al. 2010; Mientus et al. 2017). Peters et al. (2017) beschrieb außerdem erstmals eine Polyol Dehydrogenase, die Aktivität gegenüber nur drei Substraten aus über 50 getesteten Substraten zeigte und somit ein ungewöhnlich kleines Substratspektrum aufwies. Weitere bereits charakterisierte membranständige Dehydrogenasen sind die FAD-abhängige Sorbitol Dehydrogenase (mSDH), die PQQ-abhängige Inositol Dehydrogenase (mIDH), die FAD-abhängige D-Lactat Dehydrogenase (mLDH) und die FAD-abhängige Fructose Dehydrogenase (mFDH), die spezifisch nur D-Sorbitol und D-Mannitol (mSDH), *myo*-Inositol (mIDH), D-Lactat (mLDH) und D-Fructose (mFDH) oxidieren (Ameyama et al. 1981b; Shinagawa et al. 1982; Hölscher et al. 2007; Peters et al. 2017; Mientus et al. 2017).

#### **1.4 Expressions- und Deletionssysteme für *G. oxydans***

Die Verfügbarkeit geeigneter Expressions- und Deletionssysteme war für die Charakterisierung von Essigsäurebakterien und die Entwicklung von Stämmen für den Einsatz in industriellen Produktionsprozessen unerlässlich. Durch Deletionen und Komplementationen können Zusammenhänge zwischen membranständigen Dehydrogenasen und deren Substraten untersucht werden. Auch die Möglichkeit der Deletion von Enzymen, die konkurrierende Reaktionen zu einer industriell bedeutenden Oxidation katalysieren, sowie die Überexpression von Zielgenen ist für die Weiterentwicklung von industriell eingesetzten Essigsäurebakterien-Stämmen wichtig.

Erste Deletionssysteme verwendeten Antibiotikaresistenz-Kassetten, die im Zielgen von Essigsäurebakterien eingefügt wurden und eine einfache Möglichkeit bereit stellten, um Deletionsmutanten zu erzeugen (Hölscher und Görisch 2006; Hölscher et al. 2007). Jedoch war die Anzahl der möglichen Deletionen in einem Stamm durch die Verfügbarkeit an vorhandenen Antibiotikaresistenz-Kassetten begrenzt und Insertionen nicht möglich. Neuere Deletionssysteme

basieren auf einen zweistufigen Mechanismus (Junker 2012; Kostner 2013). Im ersten Schritt wird ein Deletionsplasmid über homologe Bereiche, die flankierend *upstream* und *downstream* zum Zielgen liegen, in das Genom integriert. Die Selektion erfolgt wie bei der vorherigen beschriebenen Methode über eine Antibiotikaresistenz-Kassette, die auf dem Deletionsplasmid kodiert ist. Durch den Einsatz eines Gegenselektionsmarkers in einem zweiten Schritt wird das Deletionsplasmid wieder aus dem Genom entfernt, womit entweder wieder der ursprüngliche Zustand im Bereich des Zielgens hergestellt wird oder eine Deletion des Zielgens erfolgt. Der Vorteil dieser Methoden besteht in der Entfernung der Selektionsmarker und der Konstruktion von markerfreien Deletionsmutanten, wodurch auch mehrere Deletionen oder Insertionen in einem Stamm durchgeführt werden können. Als Gegenselektionsmarker werden häufig Gene verwendet, die im Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel beteiligt sind. Eines dieser Deletionssysteme verwendet das *upp*-Gen als Gegenselektionsmarker, das eine Uracil-Phosphoribosyltransferase kodiert (Junker 2012). Die Uracil-Phosphoribosyltransferase katalysiert die Umsetzung von Uracil zu Uridinmonophosphat, welches ein wichtiges Zwischenprodukt in der Pyrimidinbiosynthese darstellt (Martinussen und Hammer 1994). Zur Gegenselektion wird das Basenanalogon 5-Fluorouracil verwendet, das in Verbindung mit der Uracil-Phosphoribosyltransferase eine toxische Wirkung auf die Zelle hat. 5-Fluorouracil wird von der Uracil-Phosphoribosyltransferase zu 5-Fluorouridinmonophosphat umgesetzt, das weiter zu Fluorodesoxyuridinmonophosphat reagiert und an die Thymidylat-Synthase bindet. Diese wird durch die Bindung des Fluorodesoxyuridinmonophosphat inaktiviert, wodurch Thymidylat, ein wichtiges Zwischenprodukt der Thymidin-Synthese, nicht mehr gebildet werden kann. Voraussetzung für die Verwendung des Deletionssystems ist, dass das *upp*-Gen nur auf dem Deletionsplasmid kodiert ist und daher vorher gegebenenfalls im verwendeten Essigsäurebakterium deletiert wurde. Die vorausgehende Deletion des *upp*-Gens stellt jedoch einen gravierenden Eingriff in den Stoffwechsel der Zelle dar und macht die Supplementation mit Thymidin notwendig. Mit Hilfe dieses Deletionssystems konstruierte Peters (2013) Multideletionsstämme aus *G. oxydans* 621H, in dem er sukzessive alle bekannten membranständigen Dehydrogenasen im Genom deletierte. Die 9-fach Mutante *G. oxydans* 621H BP.9 wurde genutzt, um homologe und heterologe membranständige Dehydrogenasen zu exprimieren und zu charakterisieren, da die Deletionen der nativen membranständigen Dehydrogenasen Neben- und Folgereaktionen verhindern und somit eine vollständige Aufklärung der Expression und der Aktivitäten einzelner membranständiger Dehydrogenasen erlauben (Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017). Eine Weiterentwicklung dieses Systems ist das Deletionssystem von Kostner (2013). Als Gegenselektionsmarker fungieren bei diesem markerfreien Deletionssystem die Gene *codA* und *codB* aus *E. coli*, die eine Cytosin-Deaminase (*codA*) und eine Cytosin Permease (*codB*) kodieren. Die Cytosin-Deaminase katalysiert die Umwandlung von Cytosin und Wasser zu Uracil und Ammoniak und liegt damit im Pyrimidin-Stoffwechsel direkt vor der Uracil-Phosphoribosyltransferase. Zur Gegenselektion wird das Cytosinanalogue 5-Fluorocytosin verwendet, das durch die Cytosin-Deaminase zu 5-Fluorouracil umgewandelt wird. Dessen toxische Wirkung entfaltet sich schon wie

zuvor durch Einschleusung des 5-Fluorouracils in den Pyrimidin-Stoffwechsel über die Uracil-Phosphoribosyltransferase. Die Cytosin Permease erleichtert die Aufnahme des 5-Fluorocytosins in die Zelle und steigert dadurch die Effizienz des Deletionssystems beträchtlich (Kostner et al. 2013). Dieses System benötigt somit keine vorausgehende Mutation oder Zugabe von Thymidin im Nährmedium und kann direkt in Wildtypstämmen angewandt werden.

Auch die Überexpression von membranständigen Dehydrogenasen wurde mit verschiedenen Plasmiden getestet und beschrieben. Die *sldAB*-Gene aus *G. oxydans* IFO 3255 wurden in die Plasmide pCRII und pVK100 integriert und die Expression und Aktivität der Polyol Dehydrogenase in *E. coli* untersucht. Gao et al. (2014) entwickelten das Plasmid pGUC zur Expression verschiedener Sorbose Dehydrogenasen und L-Sorboson Dehydrogenasen in *G. oxydans* WSH-003, um die Vitamin C-Vorstufe 2-Keto-L-Gulonsäure zu produzieren. Die meisten verwendeten Klonierungsvektoren zur Überexpression von membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien basieren jedoch auf Derivaten des Klonierungsvektors pBBR1-MCS von Kovach et al. (1995). Merfort et al. (2006b) nutzte die Plasmide pBBR1-MCS2 und pBBR1-MCS5 zur Expression der *mgdh*- und *ga5dh*-Gene in *G. oxydans* 621H, um die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose zu steigern. Auch die Produktion von Dihydroxyaceton aus Glycerol wurde durch die Überexpression der Sorbitol-Dehydrogenase mit einem Plasmid basierend auf pBBR1-MCS4 in *G. oxydans* 621H erhöht (Lu et al. 2012). Schleyer et al. (2008) entwickelten aus dem Derivat pBBR1MCS5- $P_{\text{tufB}}$ -*sldh* von Merfort et al. (2006a) das Plasmid pEXGOX, dass auf die Expression von homologen und heterologen Genen in *G. oxydans* abgestimmt wurde. Das Plasmid pEXGOX(K) wurde wiederum verwendet, um das Plasmid pJV17 zu konstruieren, mit dem die *sldAB*-Gene in *G. oxydans* DSM 7145 exprimiert und die Auswirkungen auf die Oxidation von *meso*-Erythritol untersucht wurden (Voss 2009). Das von Mientus et al. (2017) beschriebene Expressionssystem, aufgebaut auf dem Expressionsplasmid pJV17, wurde für die Charakterisierung der membranständigen Dehydrogenasen aus *G. oxydans* 621H genutzt und auch in der vorliegenden Arbeit für die Expression von membranständigen Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien verwendet.

## 1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer und hocheffizienter Ganzzellkatalysatoren basierend auf unvollständigen Oxidationen von membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien. Die weite Verbreitung von Essigsäurebakterien und die mittlerweile schnellen und kostengünstigen Sequenzierungstechniken für ganze Genome ermöglichen den Zugriff auf eine Vielzahl an möglichen Katalysatoren, die für biotechnologische Prozesse eingesetzt werden könnten. Als Ausgangspunkt diente der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9, in dem neun membranständige Dehydrogenasen deletiert wurden und eine Expression einzelner membranständiger Dehydrogenasen ermöglichte (Peters 2013).

Der Fokus der Arbeit lag auf der Entwicklung von Ganzzellkatalysatoren für zwei industriell bedeutende biotechnologische Anwendungen von Essigsäurebakterien – die Produktion von L-Erythrose, die in der Kosmetikindustrie als Bestandteil von Selbstbräunern eingesetzt wird, und 5-Keto-D-Gluconat, das als Vorläufer für die Vitamin C-Synthese und Weinsäure dient. Es sollten Stämme basierend auf *G. oxydans* 621H entwickelt werden, die L-Erythrose aus *meso*-Erythritol in einer einstufigen Oxidation und 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose in einer zweistufigen Oxidation schnell und mit hoher Effizienz produzieren. Die einzelnen Reaktionen werden durch membranständige Glucose und Polyol Dehydrogenasen katalysiert, weshalb diese Enzyme im Mittelpunkt der Untersuchungen standen. Um optimale Enzyme für die genannten Reaktionen zu ermitteln, sollten zunächst membranständige Dehydrogenasen in verschiedenen Essigsäurebakterien durch bioinformatische Methoden identifiziert und durch Expression der entsprechenden Gene im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 die Oxidationspotenziale und Substratspektren in Ganzzell-DCPIP-Assays bestimmt werden. Anschließend sollte die Expression der Enzyme durch verschiedene Promotoren und Expressionssysteme optimiert werden. Ebenso sollten die Bedingungen der Produktion von L-Erythrose und 5-Keto-D-Gluconat in Biotransformationen überprüft und eine geeignete Analytik der Substrate und Produkte etabliert werden. Aufgrund der Vielseitigkeit von membranständigen Dehydrogenasen sollte außerdem die Möglichkeit weiterer Ganzzellkatalysen basierend auf Oxidationen mit membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien und Enzyme

Alle verwendeten Materialien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von den Firmen AppliChem, Merck, Sigma Aldrich oder TCI bezogen und hatten mindestens den Reinheitsgrad reinst (Gehalt von 99 %). Für Analysen wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p. a. (pro analysi) eingesetzt.

### 2.2 Molekularbiologische Arbeiten

#### 2.2.1 Isolation von DNA

##### Isolation von genomischer DNA aus Acetobacteraceae

Genomische DNA von *G. oxydans* wurde mithilfe des MasterPure™ DNA Purification Kit von Epicentre isoliert. Der eingesetzte TE-Puffer, sowie die Proteinase K- und RNase-Lösung wurden selbst hergestellt. Zur Isolation wurden die Zellen aus 2 mL einer Übernachtskultur eines Acetobacteraceae Stammes bei 11.000 x g in einer Tischzentrifuge MIKRO 200R von Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) geerntet. Das Pellet wurde in 150 µL TE-Puffer (10 mM Tris·HCl, pH 8 mit 1 mM EDTA, pH 8) gelöst. 150 µL 2 x T and C Lysis Solution und 1 µL Proteinase K (50 mg mL<sup>-1</sup>) wurden hinzugefügt und die Lösung 15 min bei 65 °C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden kurz auf Eis gekühlt, mit 10 µL RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>) weitere 30 min bei 37 °C inkubiert und wiederum kurz auf Eis gekühlt. Um die Proteine und Zelltrümmer auszufällen und abzutrennen, wurde der Ansatz mit 150 µL MPC Protein Precipitation Reagent versetzt und für 10 min bei 4 °C und 11.000 x g in einer Tischzentrifuge MIKRO 200R von Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µL Isopropanol gemischt und die DNA durch Invertieren der Lösung gefällt. Durch eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 11.000 x g wurde die genomische DNA pelletiert. Das Pellet wurde schließlich zweimal mit 100 µL 70 % Ethanol gewaschen, um alle Isopropanol-Reste zu entfernen. Nach Trocknung des Pellets bei 37 °C wurde die genomische DNA in 100 µL H<sub>2</sub>O dest. gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kits von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) aus 2 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* isoliert. Das Vorgehen entsprach dabei den Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µL H<sub>2</sub>O dest. von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrollen**

Zur Bestimmung der Konzentration von isolierter DNA und zur Überprüfung ihrer Reinheit wurde ein NanoDrop® ND 3300 Spektrometer von Peqlab (Erlangen, Deutschland) eingesetzt. Durch die Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei 260 nm wurde die Konzentration der DNA bestimmt. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Reinheit der DNA verschiedene Quotienten an optischen Dichten kontrolliert. Durch das Verhältnis der OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> konnten Kontaminationen durch Proteine nachgewiesen werden. Hier wurde ein Wert von 1,8 als optimal angesehen (Sambrook et al. 1989). Der Quotient OD<sub>260</sub>:OD<sub>230</sub> sollte idealerweise zwischen 2,0 – 2,2 liegen und zeigte bei einem abweichenden Wert beispielsweise mögliche Verunreinigungen mit Zuckern oder Salzen an. Als Nullabgleich für die Messungen diente der Elutionspuffer des verwendeten Kits oder H<sub>2</sub>O dest.. Da diese Methode teilweise fehleranfällig ist, wurden zusätzlich Agarose-Gelelektrophoresen zur Kontrolle der DNA genutzt.

#### **2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese**

##### **Analytische Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel mit 0,8 % Agarose in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) verwendet, das in eine am Lehrstuhl hergestellte Gelkammer gegossen wurde. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Die Proben wurden mit 6-fach konzentrierten Ladepuffer im Verhältnis 1:5 (v/v) gemischt, wenn dieser nicht bereits im vorherigen Reaktionspuffer enthalten war, und in die durch Kämme im Gel ausgesparten Kammern geladen. Zur späteren Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurden zusätzlich die Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder oder O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) in mindestens eine Kammer geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 35 min. Das Gel wurde für 10 – 20 min in 1 mg mL<sup>-1</sup> Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht (302 nm) mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Alphaimager Mini von Protein Simple (Santa Clara, USA) festgehalten.

### **50x TAE-Puffer**

Tris	242 g
Eisessig	57,1 mL
Na <sub>2</sub> EDTA·2 H <sub>2</sub> O	9,3 g
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000 mL
pH 8,0 (2 M HCl)	

### **Präparative Agarose-Gelelektrophorese**

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Die Vorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese war analog zu der zuvor beschriebenen analytischen Gelelektrophorese. Nach der Färbung des Gels im Ethidiumbromid-Bad wurde die gewünschte Bande unter dem UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) gereinigt. Die Elution erfolgte dabei in zwei Schritten mit jeweils 25 µL H<sub>2</sub>O dest.. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.4 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Pro Sequenzierungsansatz wurden mindestens 150 ng DNA für PCR-Produkte bzw. 750 ng DNA für Plasmide eingesetzt und 20 pmol Sequenzierprimer hinzugefügt. Die Sequenzierergebnisse wurden mit Clone Manager 9 Professional von Scientific and Educational Software (Denver, USA) ausgewertet.

#### **2.2.5 Polymerase Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1986 von Mullis et al. beschrieben und ist eine Standardmethode in der Molekularbiologie. Sie dient zur Vervielfältigung kleiner DNA-Fragmente und wurde für präparative und analytische Zwecke genutzt. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 aufgelistet.

### 2.2.5.1 Präparative PCR

Für die Amplifikation von DNA Fragmenten für Klonierungen oder Sequenzierungen war die Verwendung einer Polymerase mit Korrekturlese-Funktion essenziell, um Fehler bei der Vervielfältigung der DNA zu minimieren. Für präparative PCR-Ansätze wurde daher die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) oder die PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase von Takara Bio Inc. (Shiga, Japan) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler Biometra TRIO oder einem FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt und die Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, aufgetrennt. Die Fragmente wurden je nach Reinheitsgrad der PCR-Produkte direkt aus dem PCR-Ansatz oder mittels Gelextraktion mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) gereinigt. Nachfolgend sind die Reaktionsansätze und Standardprogramme für die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase und die PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase aufgeführt.

#### PCR-Ansatz für Phusion™ Polymerase (50 µL)

5x HF Puffer	10 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µl
Vorwärts Primer (5 µM)	2,5 µl
Rückwärts Primer (5 µM)	2,5 µl
Phusion™ HF DNA Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O dest.	33,25 µL
genomische DNA (50-250 ng) bzw. Plasmid-DNA (1 pg-10 ng)	1 µL

#### PCR-Programm für Phusion™ Polymerase

Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	30 s	← 30 Zyklen
Annealing	T <sub>M</sub> *	30 s	
Elongation	72 °C	30 s / kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

\* Die Annealing Temperatur wurde jeweils den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepasst, die in Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 im Anhang aufgelistet sind. Die Schmelztemperatur wurde durch das Programm Clone Manager 9 Professional berechnet, das auch für das Primer-Design genutzt wurde.

### PCR-Ansatz für PrimeSTAR GXL Polymerase (50 µL)

5x GXL Puffer	10 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
Vorwärts Primer (5 µM)	2,5 µl
Rückwärts Primer (5 µM)	2,5 µl
PrimeSTAR® GXL Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O dest.	32 µL
genomische DNA (50-250 ng) bzw. Plasmid-DNA (1 pg-10 ng)	1 µL

### PCR-Programm für PrimeSTAR GXL Polymerase

Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	30 s	← 30 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	68 °C	1 min / kb	
Finale Elongation	68 °C	10 min	

#### 2.2.5.2 Analytische PCR

Die analytische PCR wurde zur Überprüfung von Klonen nach Transformationen und Konjugationen, sowie zur Stammkontrolle bei verschiedenen Experimenten genutzt. Um auch längere Fragmente schnell und zuverlässig zu amplifizieren, wurde die Phire™ Hot Start II DNA Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Sie besitzt zwar keine 5'→3' Exonuklease Aktivität, die für die Korrekturlesefunktion der Polymerase verantwortlich ist, jedoch bietet sie eine hohe Robustheit und eine kurze Elongationszeit. Durch die lange initiale Denaturierung wurden die Zellen lysiert und die DNA für die Amplifikation zugänglich. Zur Analyse einer Kolonie wurden wenige Zellen mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und als Template zu dem Ansatz gegeben. Sollte eine Flüssigkultur überprüft werden, wurde im Standard-Reaktionsansatz 1µL H<sub>2</sub>O dest. weniger eingesetzt und als Template dafür 1 µL der Kultur steril zugegeben. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler Biometra TRIO oder einem FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt und die Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, aufgetrennt und die Ergebnisse dokumentiert. Nachfolgend sind der Standard-Reaktionsansatz und das PCR-Programm für die analytische PCR aufgeführt.

**PCR-Ansatz für analytische PCR (20 µL)**

5x Puffer	4 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,4 µl
Vorwärts Primer (5 µM)	1 µl
Rückwärts Primer (5 µM)	1 µl
Phire™ Hot Start II Polymerase	0,2 µl
H <sub>2</sub> O dest.	13,4 µL

**PCR-Programm für analytische PCR**

Initiale Denaturierung	98 °C	8 min	
Denaturierung	98 °C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	T <sub>M</sub> *	30 s	
Elongation	72 °C	15 s / kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

\* Die Annealing Temperatur wurde jeweils den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepasst. Die Schmelztemperatur wurde durch das Programm Clone Manager 9 Professional berechnet, das auch für das Primer-Design genutzt wurde.

**2.2.6 Mutagenese von DNA Sequenzen**

**Ortsspezifische Mutagenese**

Die ortsspezifische Mutagenese diente der gezielten Veränderung der DNA-Sequenz eines Gens. Dazu wurden Primer-Paare eingesetzt, die die gewünschte Mutation trugen, und diese mit Primern zur Amplifikation des Zielgens kombiniert (Abbildung 2-1). Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6-2 zusammengefasst. Die Reaktion erfolgte analog zu der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen präparativen PCR. Die Ligation der beiden Genfragmente und des Plasmid-Rückgrats wurde mit der SLiCE-Klonierungsmethode durchgeführt (Kapitel 2.2.8).

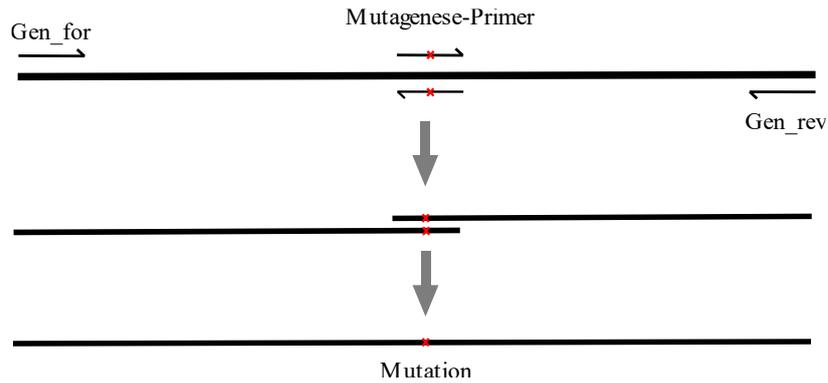


Abbildung 2-1. Konzeption und Ablauf der ortsspezifischen Mutagenese mit Mutagenese-Primern

### Error Prone PCR (nach Cadwell und Joyce 1992)

Bei der Error Prone PCR wurde die natürliche Fehlereinbaurrate der verwendeten Polymerase erhöht, um eine zufällige Mutagenese eines Zielgens zu ermöglichen. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an dNTPs und Mangan(II)-chlorid in den PCR-Reaktionsansätzen eingesetzt, um die Fehlerrate der Polymerase zu erhöhen. Als Polymerase wurde eine *Taq* DNA Polymerase von New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland) verwendet, die keine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt und somit die entstandenen Mutationen nicht korrigieren konnte. Der Standardansatz und das PCR-Programm der Error Prone PCR sind nachfolgend aufgeführt.

### PCR-Ansatz für Error Prone PCR (40 µL)

ThermoPol Puffer	4 µl
dNTPs (25mM dCTP/dTTP, 5mM dATP/dGTP)	1 µl
Vorwärts Primer (5 µM)	2 µl
Rückwärts Primer (5 µM)	2 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,5 µl
Plasmid-DNA (1 ng)	1 µL
DMSO (100%)	1µL
MnCl <sub>2</sub> (0 mM / 4 mM / 8 mM)	1 µL
H <sub>2</sub> O dest.	27,5 µL

### PCR-Programm für Error Prone PCR

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	30 Zyklen
Annealing	59 °C	30 s	
Elongation	68 °C	1 min / kb	
Finale Elongation	68 °C	5 min	

### 2.2.7 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen dient der bakteriellen Zelle als Schutz gegen Fremd-DNA wie z.B. der DNA von Bakteriophagen (Arber und Linn 1969). Die Enzyme erkennen die Fremd-DNA an der fehlenden Methylierung und hydrolysieren sie an spezifischen Basensequenzen (Restriktionsschnittstellen). Durch die spezifischen Schnittstellen sind die Schnittmuster in DNA-Strängen genau definiert und können mithilfe von DNA-Analyseprogrammen wie Clone Manager Professional von Scientific and Educational Software (Denver, USA) vorausgesagt werden. Der Restriktionsverdau wurde daher als Methode zur Überprüfung von DNA-Sequenzen bei Klonierungen verwendet. Außerdem wurde nach PCR-Reaktionen mit Plasmiden als Template ein Verdau mit *DpnI* eingesetzt, da dieses Restriktionsenzym nur DNA hydrolysiert, wenn die *DpnI*-Restriktionsschnittstelle methyliert vorliegt. Dadurch konnte die ursprüngliche Vektor-DNA vor einer Transformation in *E. coli* aus dem Klonierungsansatz entfernt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

#### Analytischer Verdau

Der analytische Verdau wurde mit FastDigest™ Restriktionsenzymen von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) in PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden 7 µL einer Plasmid-DNA oder eines PCR-Produkts (0,2 – 0,5 µg) mit 2 µL 10 x FastDigest™ Puffer, 1 µL Restriktionsenzym (FD) und 10 µL H<sub>2</sub>O dest. gemischt und in einem Thermocycler Biometra TRIO oder einem FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) inkubiert. Bei Verwendung von mehreren Restriktionsenzymen in einem Ansatz wurde die Menge an H<sub>2</sub>O dest. angepasst. Die benötigten Reaktions- und Inaktivierungstemperaturen, sowie die Inkubationsdauer variierte je nach Enzym und wurden nach Angaben des Herstellers eingestellt. Die verdauten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.3) aufgetrennt und analysiert.

#### *DpnI*-Verdau

Das Restriktionsenzym *DpnI* spaltet DNA nur, wenn die Restriktionsschnittstelle methyliert ist. Damit eignete sich dieses Restriktionsenzym, um ursprüngliche Vektor-DNA aus PCR-Ansätzen für Klonierungszwecke zu entfernen. Der Verdau mit FastDigest™ *DpnI* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) wurde ebenfalls in PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. 42,5 µL der gereinigten PCR Produkte wurden mit 5 µL 10 x FastDigest™ Puffer und 2,5 µL FastDigest™ *DpnI* gemischt und in einem Thermocycler Biometra TRIO oder einem FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C für

5 min inaktiviert. Die DNA wurde mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) gereinigt.

### 2.2.8 Ligation mit SLiCE-Klonierungsmethode

Die SLiCE Klonierungsmethode von Zhang et al. (2012) beschreibt eine Klonierungsmethode bei der durch Enzyme im Zellextrakt des *E. coli* Stammes PPY (Tabelle 2-1) mehrere DNA-Fragmente in einem Schritt über eine *in vitro* Rekombination ligiert werden können. Dazu wurden kurze homologe Regionen von 20 bis 40 bp an den Enden der DNA-Fragmente beispielsweise durch geeignetes Primer-Design generiert, durch die DNA-Fragmente in einer definierten Reihenfolge während der Reaktion ligiert wurden. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 aufgelistet.

Zur Vorbereitung der SLiCE-Reaktion wurden der Vektor und die zu inserierende DNA (Insert) mittels präparativer PCR (Kapitel 2.2.5.1) mit ca. 20 bp-Überhängen, die homolog zu der Vektor- bzw. Insert-DNA waren, amplifiziert und die Produkte anschließend gereinigt. Bei Verwendung von Plasmid-DNA als Template wurde mit den Amplifikaten zusätzlich ein *DpnI*-Verdau durchgeführt (Kapitel 2.2.6), um die ursprüngliche Vektor-DNA aus dem Ansatz zu entfernen. Für die SLiCE-Reaktion in PCR-Reaktionsgefäßen wurden pro Ansatz 16 µL DNA mit einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert zwischen 1:1 bis 1:5 (v/v) eingesetzt und mit 2 µL T4 DNA Ligase Puffer und 2 µL Zellextrakt von *E. coli* PPY gemischt. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler Biometra TRIO oder einem FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Reaktion wurde anschließend durch Auftrennung der Reaktionsprodukte in einer Agarose-Gelelektrophorese mit 5 µL der Reaktionslösung überprüft (Kapitel 2.2.3). Für die Transformation der ligierten Plasmide in *E. coli* wurden 10 µL eines SLiCE-Ansatzes eingesetzt (Kapitel 2.3.3).

## 2.3 Mikrobiologische Arbeiten

### 2.3.1 Organismen und Plasmide

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten oder konstruierten Stämme und die dafür genutzten Plasmide aufgelistet. In Tabelle 2-1 sind alle *E. coli* Stämme, die für Klonierungen und Konjugationen genutzt wurden, und die für das Antibiotika-Screening verwendeten Stämme aufgeführt.

**Tabelle 2-1.** Verwendete Stämme von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
<i>E. coli</i> DH10 $\beta$	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda^-$ <i>rpsL(Str<sup>R</sup>)</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>-</sup> <i>thi-1</i> <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ) <i>supE44</i> <i>recA13</i> <i>ara-14</i> <i>leuB6</i> <i>proA2</i> <i>lacY1</i> <i>galK2</i> <i>rpsL20</i> ( <i>str</i> <sup>r</sup> ) <i>xyl-5</i> <i>mtl-1</i> , Plasmid pRK2013	(Boyer und Roulland-Dussoix 1969; Figurski und Helinski 1979)
<i>E. coli</i> K12 (MG 1655)	F <sup>-</sup> $\lambda^-$ <i>ilvG</i> <sup>-</sup> <i>rfb-50</i> <i>rph-1</i>	
<i>E. coli</i> PPY	F <sup>-</sup> <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i> $\Delta lacX74$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ <i>araD139</i> $\Delta(ara,leu)7697$ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ <i>cynX</i> :: [ <i>araC</i> pBAD- <i>red<math>\alpha</math></i> EM7- <i>red<math>\beta</math></i> Tn5- <i>gam</i> ] $\lambda^-$	(Zhang et al. 2012)
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda^-$ <i>rpsL(Str<sup>R</sup>)</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> Z $\Delta M15$ , Tn10(Tet <sup>r</sup> )].	Stratagene
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20232		Rosenbach 1884

Alle Essigsäurebakterien-Stämme und -Isolate, die für Substratscreenings und Klonierungszwecke eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

**Tabelle 2-2.** Essigsäurebakterien aus der lehrstuhl internen Stammsammlung

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Interne Stammnr.	Referenz / Quelle
<i>Acetobacter aceti</i> DSM 3508	Wildtyp	62	Pasteur (1864), Beijerinck (1898)
<i>Acetobacter indonesiensis</i> NBRC 16471	Wildtyp	615	Lisdiyanti et al. (2001), Prof. König (Universität Mainz)
<i>Acetobacter orleanensis</i> DSM 4492	Wildtyp	474	Henneberg (1906), Lisdiyanti et al. (2001)
<i>Acetobacter pasteurianus</i> B803	Isolat	600	Prof. König (Universität Mainz)
<i>Acetobacter pasteurianus</i> DSM 3509	Wildtyp	642	Hansen (1879), Beijerinck und Folpmers (1916)
<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1513	Wildtyp	510	Hansen (1879), Beijerinck and Folpmers (1916)
<i>Acetobacter pasteurianus</i> UMCC 1733	Isolat	587	(Vero et al. 2006)
<i>Acetobacter pasteurianus</i> UMCC 1786	Isolat	590	(Wu et al. 2010)
<i>Acetobacter species</i> B945	Isolat	612	Prof. König (Universität Mainz)
<i>Ameyamaea chiangmaiensis</i> NBRC 103196	Wildtyp	618	(Yukphan et al. 2009)
<i>Asaia bogorensis</i> Isolat	Isolat	625	Prof. Guidici (Universität Modena und Reggio Emilia)
<i>Asaia krungthepensis</i> NBRC 100057	Wildtyp	623	(Yukphan et al. 2004)
<i>Asaia lannensis</i> NBRC 102526	Wildtyp	624	(Malimas et al. 2008)
<i>Asaia spathodeae</i> NBRC 105894	Wildtyp	619	(Kommanee et al. 2010)
<i>Asaia species</i> B955	Isolat	620	Prof. König (Universität Mainz)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI5	Wildtyp	506	Gillis et al. (1989), Yamada et al. (1998)
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> DSM 5603	Wildtyp	58	Asai (1935), Yamada et al. (1998)
<i>Gluconobacter albidus</i> TMW2.1191	Isolat	566	(Asai et al. 1964), Prof. Vogel (TUM)
<i>Gluconobacter cerinus</i> Isolat 1	Wildtyp	72	Prof. Liebl (TUM)

**Fortsetzung Tabelle 2-2.** Essigsäurebakterien aus der lehrstuhl internen Stammsammlung

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Interne Stammnr.	Referenz / Quelle
<i>Gluconobacter cerinus</i> Isolat 2	Isolat	81	Prof. Vogel (TUM)
<i>Gluconobacter cerinus</i> Isolat 3	Isolat	645	Kostner (2015)
<i>Gluconobacter cerinus</i> DSM 9533	Wildtyp	627	Yamada und Akita (1984), Katsura et al. (2002)
<i>Gluconobacter frateurii</i> Isolat	Isolat	83	Prof. Vogel (TUM)
<i>Gluconobacter japonicus</i> LMG 1417	Wildtyp	76	Malimas et al. (2009), Li et al. (2017)
<i>Gluconobacter kondonii</i> NBRC 3266	Wildtyp	621	Malimas et al. (2007)
<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 9937	Wildtyp	60	De Ley (1961)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003	Wildtyp	47	De Ley (1961), Mason und Claus (1989)
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H (DSM 2343)	Wildtyp, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup>	48	Gillis und de Ley (1980), de Ley (1984)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 3503	Wildtyp	57	De Ley (1961), Mason und Claus (1989)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 3504	Wildtyp	59	Motizuki et al. (1966)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 46615	Wildtyp	54	De Ley (1961), Mason und Claus (1989)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 50049	Wildtyp	80	De Ley (1961), Mason und Claus (1989)
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 7145	Wildtyp	233	De Ley (1961), Mason und Claus (1989)
<i>Gluconobacter oxydans species</i> E22	Isolat	599	Prof. Becker (TUM)
<i>Gluconobacter species</i> .018	Isolat	82	Prof. Vogel (TUM)
<i>Gluconobacter species</i> B789	Isolat	597	Prof. König (Universität Mainz)
<i>Gluconobacter species</i> B790	Isolat	598	Prof. König (Universität Mainz)
<i>Komagataeibacter europaeus</i> UMCC 1744	Isolat	588	Prof. Guidici (Universität Modena und Reggio Emilia)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> LMG 1524	Wildtyp	469	Gillis et al. (1983)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> LMG 1527	Wildtyp	601	Gosselé et al. (1983), Yamada et al. (2013)

**Fortsetzung Tabelle 2-2.** Essigsäurebakterien aus der lehrstuhl internen Stammsammlung

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Interne Stammnr.	Referenz / Quelle
<i>Komagataeibacter hansenii</i> LMG 1528	Wildtyp	604	Gosselé et al. (1983), Yamada et al. (2013)
<i>Komagataeibacter medellinensis</i> LMG 1693	Wildtyp	470	Yamada (2014)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 6513	Wildtyp	234	Brown (1886), Yamada et al. (2013)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> UMCC 2756	Wildtyp	591	Guoolo et al. (2019)
<i>Neosasaia (N.) Chiangmaiensis</i> NBRC 101099	Wildtyp	629	Yukphan (2005)
<i>Tanticharoenia (T.) sakaeratensis</i> NBRC 103193	Wildtyp	622	Yukphan (2008)

Alle in dieser Arbeit genutzten und konstruierten Multideletionsstämme und Insertionsmutanten sind in Tabelle 2-3 beschrieben. Die dazu benötigten Insertionsplasmide sind in Tabelle 2-4 aufgelistet.

**Tabelle 2-3.** Verwendete und konstruierte Multideletionsstämme und Insertionsmutanten

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
<i>G. oxydans</i> 621H pMM2	pJV17 Derivat; <i>mob rep</i> Km <sup>R</sup> leeres Kontrollplasmid, <i>Δupp</i>	Mientus et al. (2017)
BP.8	Multideletionsstamm von <i>G. oxydans</i> 621H mit alleiniger Expression der Polyol Dehydrogenase, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup> , <i>Δupp ΔGOX_RS06485 ΔGOX_RS06490 ΔGOX_RS10540 ΔGOX_RS04040 ΔGOX_RS04045 ΔGOX_RS04050 ΔGOX_RS11745 ΔGOX_RS11750 ΔGOX_RS11755 ΔGOX_RS07330 ΔGOX_RS07335 ΔGOX_RS07340 ΔGOX_RS02475 ΔGOX_RS08435 ΔGOX_RS03725</i>	Peters (2013)
BP.9	Multideletionsstamm von <i>G. oxydans</i> 621H, FC <sup>R</sup> , Cef <sup>R</sup> , <i>Δupp, ΔGOX_RS06485 ΔGOX_RS06490 ΔGOX_RS10540 ΔGOX_RS04040 ΔGOX_RS04045 ΔGOX_RS04050 ΔGOX_RS11745 ΔGOX_RS11750 ΔGOX_RS11755 ΔGOX_RS07330 ΔGOX_RS07335 ΔGOX_RS07340 ΔGOX_RS02475 ΔGOX_RS08435 ΔGOX_RS03725 ΔGOX_RS05400 ΔGOX_RS05405</i>	Peters (2013)

**Fortsetzung Tabelle 2-3.** Verwendete und konstruierte Multideletionsstämme und Insertionsmutanten

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 $\Delta madh::sldAB$	BP.9 mit Insertion der <i>sldAB</i> Gene aus <i>G. oxydans</i> 621H in den Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (GOX_RS06485-90)	Peters (2013)
BP.9 $\Delta g2dh::sldAB$	BP.9 mit Insertion der <i>sldAB</i> Gene aus <i>G. oxydans</i> 621H in den Locus der Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX_RS07330-40)	Diese Arbeit
BP.8 <i>sldAB::tufB<sub>Prom</sub></i>	BP.9 mit Insertion der <i>tufB</i> -Promotorsequenz <i>upstream</i> der <i>sldAB</i> Gene (GOX_RS5400-05)	Diese Arbeit
BP.8 $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$	BP.9 mit Insertion der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus <i>G. oxydans</i> 621H (GOX_RS02475) in ihren nativen Locus	Diese Arbeit
BP.8 $\Delta madh::mgdh1_{3504}$	BP.9 mit Insertion der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 (GLS_c02870) in den Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase	Diese Arbeit

**Tabelle 2-4.** Auflistung der verwendeten Insertionsplasmide

Plasmid	Beschreibung
pKOS6b	Integrierender Deletionsvektor, <i>mob</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , Km <sup>R</sup> , FC <sup>S</sup> (Kostner et al. 2013)
pKOS6b-InsSldAB621H_LocG2DH	Derivat von pKOS6b; Plasmid für die Insertion der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H in den Locus der Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX_RS07330-40) in BP.9
pKOS6b-InsP11sldAB_621H	Derivat von pKOS6b; Plasmid für die Insertion des Promotors des Elongationsfaktor Tu ( <i>TufB</i> ; GOX_RS03065) <i>upstream</i> des Genstarts der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) in BP.8
pKOS6b-InsGDH621H_LocGDH	Derivat von pKOS6b; Plasmid für die Insertion der mGDH (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H in ihren nativen Locus in BP.8
pKOS6b-InsGDH1_3504_LocADH	Derivat von pKOS6b; Plasmid für die Insertion der mGDH1_3504 (GLS_RS01440) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 in den Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (GOX_RS06485-90) in BP.8

Alle Expressionsstämme, die in dieser Arbeit verwendet oder generiert wurden, entstanden aus dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 (Peters et al. 2013) und sind nachfolgend in Tabelle 2-5 bis Tabelle 2-10 aufgelistet.

**Tabelle 2-5.** Verwendete und erstellte BP.9-Expressionsstämme, die Polyol Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pMM4a-mSldAB	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenase	Mientus et al. (2017)
BP.9 pADH-sldAB_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase (A0U94_RS11860-5) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191	S. Gruber, Masterarbeit (2015)
BP.9 pADH-sldAB1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB2_3504	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase 2 (GLS_RS11880-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB1_hans	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase (GXY_RS08335-40) aus <i>K. hansenii</i> LMG 1524	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB_med	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase (GLX_RS02210-5) aus <i>K. medellinensis</i> LMG 1693	Mientus (unveröffentlicht)

**Tabelle 2-6.** Verwendete und erstellte BP.9-Expressionsstämme, die die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pMM4b-mSldAB	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem Promotor der Inositol Dehydrogenase	Mienuts et al. (2017)
BP.9 pG2DH-sldAB_621H	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase	A. Peter, Masterarbeit (2016)

**Fortsetzung Tabelle 2-6.** Verwendete und erstellte BP.9-Expressionsstämme, die die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pLG2DH-sldAB_621H	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem verlängerten Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase	A. Peter, Masterarbeit (2016)
BP.9 pSDH-sldAB_621H	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem Promotor der Sorbitol Dehydrogenase	A. Peter, Masterarbeit (2016)
BP.9 pSldAB-sldAB_621H	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem nativen Promotor der Polyol Dehydrogenase	A. Peter, Masterarbeit (2016)
BP.9 pJV17	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem Promotor des Elongationsfaktor Tu	Voss (2009), A. Peter, Masterarbeit (2016)
BP.9 p452-sldAB_621H	Expression der Polyol Dehydrogenase (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit dem Promotor des ribosomalen Proteins L13	Kallnik et al. (2010), Mientus (unveröffentlicht)

**Tabelle 2-7.** Verwendete und erstellte BP.9-Expressionsstämme, die membranständige Glucose Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pMM4a-mGDH	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H	Mientus et al. (2017)
BP.9 pADH-mGDH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (A0U94_RS08490) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191	Diese Arbeit
BP.9 pADH-mGDH1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase 1 (GLS_c02870) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504	Diese Arbeit
BP.9 pADH-mGDH2_3504	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase 2 (GLS_c14360) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504	Diese Arbeit
BP.9 pADH-mGDH_hans	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GXY_RS10465) aus <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Diese Arbeit

**Fortsetzung Tabelle 2-7.** Verwendete und erstellte BP.9-Expressionsstämme, die membranständige Glucose Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pADH-mGDH_med	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GLX_RS03130) aus <i>K. medellinensis</i> LMG 1693	Diese Arbeit
BP.9 pADH-mGDH_PA15	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GDI_RS15540) aus <i>Ga. diazotrophicus</i> DSM 5601	Diese Arbeit

**Tabelle 2-8.** Konstruierte BP.9-Expressionsstämme, die eine membranständige Polyol- und Glucose Dehydrogenase aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pADH-sldAB_ pG2DH-mGDH	Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>g2dh</i> -Promotor	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB_ pLG2DH-mGDH	Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit verlängerten <i>g2dh</i> -Promotor	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB_ pmGDH-mGDH	Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit nativem Promotor	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB_ pLmGDH-mGDH	Derivat von pMM3b; Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit verlängertem nativem Promotor	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB_ pLmGDH-mGDH1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> 1 (GLS_c02870) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit verlängertem <i>mgdh</i> -Promotor aus <i>G. oxydans</i> 621H	Diese Arbeit
BP.9 pSldAB-sldAB_ pADH-mGDH1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit nativem Promotor und der <i>mgdh</i> 1 (GLS_c02870) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit <i>madh</i> -Promotor	Diese Arbeit

**Tabelle 2-9.** Sonstige konstruierte und verwendete BP.9-Expressionsstämme, die eine membranständige Dehydrogenase exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pADH-ADH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der Alkohol Dehydrogenase (A0U94_RS13110) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191	S. Gruber, Masterarbeit (2015)
BP.9 pADH-sekADH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der sekundären Alkohol Dehydrogenase (A0U94_RS09810) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191	Diese Arbeit
BP.9 pADH-mFuDH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der uncharakterisierten membranständigen Dehydrogenase 1 (A0U94_RS10160-70) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191	Diese Arbeit
BP.9 pADH-mSDH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der Sorbitol Dehydrogenase (A0U94_RS04580-90) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191	Diese Arbeit
BP.9 pADH-gcd_XC3586	Derivat von pMM3b; Expression der sekundären Alkohol Dehydrogenase (XCC3083) aus <i>X. campestris</i> DSM 3586	Diese Arbeit

**Tabelle 2-10.** BP.9-Expressionsstämme, die eine mutierte Version der Polyol Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften	Referenz / Quelle
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut1	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Ala45Gly	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut2	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Leu179Ile	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut1/2	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutationen Ala45Gly und Leu179Ile	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut3	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Leu179Val	Diese Arbeit
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut4	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Leu179Gly	Diese Arbeit

## 2.3.2 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

### 2.3.2.1 Medien und Medienzusätze

Für die Kultivierung von *E. coli* und *Staphylococcus (S.) aureus* wurde „Lysogeny broth“-Medium (LB) verwendet. Essigsäurebakterien wurden in Vollmedium (VM) oder modifiziertem Elektroporationsmedium (EPmod) kultiviert. Für die Erstellung von Insertionsmutanten wurden für die Gegenselektion die Medien VMmod Var3 und VMmod Var5 mit reduziertem Anteil von komplexen Bestandteilen wie Hefeextrakt hergestellt. Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Hitze-instabile Zusätze wurden mit Filtern mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### **LB-Medium** (Sambrook et al. 1989)

LB-Medium wurde mit 1 % Trypton aus Casein, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl hergestellt und autoklaviert. Für feste Nährmedien wurden zusätzlich 1,5 % Agar zugegeben.

#### **YENB-Medium**

Zur Herstellung von YENB-Medium wurden Bacto Yeast Extract (0,75 %) mit Bacto Nutrient Broth (0,8 %) in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 10 % Glycerol steril zugegeben.

#### **Vollmedium** (Merfort et al. 2006a)

Vollmedium (VM) beinhaltet 0,3 % Trypton aus Casein und 0,5 % Hefeextrakt. Für feste Nährmedien wurden 1,5 % Agar hinzugefügt und die Lösung mit 1 M HCl auf pH 6 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 50 mM Fructose als Kohlenstoffquelle und bei Bedarf Antibiotikazusätze und Thymidin zugegeben. Die verwendeten Zusätze und ihre eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2-11 aufgelistet.

#### **Modifiziertes Elektroporationsmedium** (nach Buchert und Viikari 1988)

Das modifizierte Elektroporationsmedium (EPmod) beinhaltet 1,5 % Hefeextrakt, 0,05 % Glycerol und 8 % D-Mannitol, sowie 1,5 % Agar für festes Nährmedium. Die Lösung wurde mit 1 M HCl auf pH 6 eingestellt und autoklaviert.

**Gegenselektionsmedien VMmod Var3 bzw. Var5 (nach Kostner 2013)**

Für die Gegenselektionsmedien zur Generierung von Insertionsmutanten wurden Trypton (0,5 %) aus Casein und trypsiniertes Fleischextrakt (0,5 %) in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und mit 1 M HCl auf pH 6 eingestellt. Bei festen Medien wurden zusätzlich 1,5 % Agar zugegeben und die Lösung autoklaviert. Anschließend wurden 50 mM steril filtrierte Fructose, sowie 60 µg L<sup>-1</sup> 5-Fluorocytosin für VMmod Var3 bzw. 120 µg L<sup>-1</sup> 5-Fluorocytosin für VMmod Var5 hinzugefügt.

**Medienzusätze**

Die in der Arbeit eingesetzten Medienzusätze wurden steril filtriert und den autoklavierten Medien zugegeben. Die Zusätze sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 2-11.** Verwendete Medienzusätze

Zusatz	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Medium
Cefoxitin	60 mg mL <sup>-1</sup>	60 µg mL <sup>-1</sup>
5-Fluorocytosin	15 mg mL <sup>-1</sup>	60 bzw. 120 µg mL <sup>-1</sup>
Kanamycin	50 mg mL <sup>-1</sup>	50 µg mL <sup>-1</sup>
Thymidin	10 mg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>

**2.3.2.2 Kultivierungsbedingungen****Kultivierung von *E. coli* und *S. aureus***

*E. coli*- und *S. aureus* wurden in Kulturröhrchen mit 5 mL LB-Medium aus Kryokulturen oder einzelnen Kolonien angeimpft. Bei Bedarf wurde dem Medium 50 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin zur Selektion hinzugefügt. Die Kultivierung der Vorkulturen erfolgte aerob bei 37 °C für maximal 24 h auf einem Rundschüttler von Infors HT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz). Hauptkulturen wurden ebenfalls in Kulturröhrchen mit 5 mL LB-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,2 angeimpft und unter identischen Bedingungen kultiviert. Feste Nährmedien wurden ebenfalls bei 37 °C für maximal 24 h inkubiert.

### **Kultivierung von Acetobacteraceae**

Die Kultivierung von Acetobacteraceae erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 30 °C. Die Stämme wurden in Kulturröhrchen mit 5 mL EPmod-Medium aus Kryokulturen oder mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Vorkulturen wurden auf einem Rundschüttler von Infors HAT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz) bei 180 rpm für maximal 72 h inkubiert. Die Hauptkulturen wurden ebenfalls in 5 mL EPmod-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,3 angeimpft und unter identischen Bedingungen für 48 h kultiviert. Die Inkubation von festen Nährmedien erfolgte bei 30 °C für bis zu 7 Tage.

Multideletionsstämme und Expressionsstämme von *G. oxydans* 621H wurden in VM bei 30 °C kultiviert. Vorkulturen wurden mit 10 mL VM mit den benötigten Zusätzen wie Thymidin und Antibiotika in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen der Firma Ochs (Bovenden – Lengler, Deutschland) aus Kryokulturen oder mit Einzelkolonien angeimpft und auf einem Rundschüttler von Infors HAT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz) bei 180 rpm für maximal 72 h inkubiert. Hauptkulturen wurden in 100 mL- oder 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 10 % Füllvolumen auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,1 bis 0,2 angeimpft und wie zuvor beschrieben für 48 h kultiviert. Stämme auf festen Nährmedien wurden bis zu 7 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### **2.3.2.3 Bestimmung der optischen Dichte**

Die optische Dichte (OD) von Zellkulturen wurde bei 600 nm in einem Jenway VIS Spektralphotometer 7310 von Bibby Scientific Limited (Stone, UK) bestimmt. Als Nullwert diente das entsprechende Medium oder Puffer, in dem die Zellen kultiviert wurden bzw. gelöst vorlagen. Die Zellsuspension wurde ab einer Absorption von 1,0 um den Faktor 1:10 (v/v) verdünnt, um die Linearität der Messung zu gewährleisten.

#### **2.3.2.4 Stammhaltung und Reinheitskontrolle**

Sowohl Essigsäurebakterien als auch *E. coli* wurden auf festen Nährmedien bis zu 30 Tage bei 4 °C gekühlt gelagert. Für eine längere Aufbewahrung wurden Kryokulturen angefertigt. Die Stämme wurden dazu in den jeweiligen Medien bis zu einer OD bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von etwa 1,5 kultiviert (Kapitel 2.3.2.2). 1 mL der Flüssigkultur wurde steril entnommen und 0,5 mL Glycerol (99%) zugegeben. Die Kryokulturen wurden bei -80 °C gelagert.

Die Reinheit der Kulturen wurde mittels Überprüfung der Stämme in PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern (Kapitel 2.2.5.2), Vereinzelung der Stämme auf festen Nährböden und durch mikroskopische Untersuchung mit einem Phasenkontrastmikroskop der Firma Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland) kontrolliert.

### 2.3.3 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Um verschiedene pMM3b- und pKOS6b-Derivate in *E. coli* DH10 $\beta$ , *E. coli* TOP10 oder *E. coli* XL1-blue zu transformieren, wurde die Hitzeschock-Methode (Sambrook et al. 1989) oder die Elektroporation (Sambrook und Russell 2001) angewandt. Für eine Transformation mittels Hitzeschock sind die Vorbereitung der kompetenten Zellen und die Durchführung der Transformation nachfolgend beschrieben.

#### Vorbereitung der kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurde eine Flüssigkultur, wie in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben, über Nacht bei 37 °C kultiviert. Daraus wurde eine Hautkultur mit 100 mL LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit einem Füllvolumen von 1 L auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und auf einem Rundschüttler von Infors HAT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz) bei 180 rpm und 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4.000 x g und 4 °C für 5 min in einer Tischzentrifuge UNIVERSAL 320 R von Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland) geerntet und die Zellen mit 50 mL einer gekühlten 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung durch eine 30 minütige Inkubation auf Eis gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 10 mL einer auf Eis gekühlten 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und mit 2 mL Glycerol (80 %) gemischt. Die kompetenten Zellen wurden in 200  $\mu$ L Portionen aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### Hitzeschocktransformation

Für die Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock wurde ein Aliquot der kompetenten *E. coli* Zellen mit 10  $\mu$ L ligierter Plasmid-DNA (Kapitel 2.2.8) oder 2  $\mu$ L einer aus Zellen isolierten Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis gekühlt, wobei sich die DNA an die bakterielle Zelloberfläche anlagerte. Durch den folgenden Hitzeschock bei 42 °C für 90 s wurde die DNA in die Zelle aufgenommen. Anschließend wurde der Ansatz nochmals 5 min auf Eis gekühlt, 900  $\mu$ L LB-Medium zugegeben und die Zellen für 45 – 60 min bei 37 °C unter Schütteln regeneriert. Anschließend wurden die Zellen bei 3.200 x g für 5 min bei Raumtemperatur mit einer Tischzentrifuge MIKRO 200R der Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) geerntet. Das Pellet wurden in 100  $\mu$ L LB-Medium gelöst und die Zellsuspension auf eine LB-Agarplatte mit 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Kanamycin aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. War ein Wachstum zu verzeichnen, wurden die Kolonien in einer analytischen PCR (Kapitel 2.2.5.2) durch passende Primer auf die Anwesenheit des transformierten Plasmids überprüft.

### **2.3.4 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation**

Als zweite Methode zur Übertragung von Plasmiden in *E. coli* wurde die Transformation mittels Elektroporation genutzt. Die Vorbereitung der elektrokompenten Zellen und die Durchführung der Elektroporation sind nachfolgend beschrieben.

#### **Vorbereitung von elektrokompenten Zellen**

Um elektrokompente *E. coli* Zellen herzustellen, wurden 400 mL YENB-Medium mit 2 mL einer Vorkultur (Kapitel 2.3.2.2) inokuliert und auf einem Rundschtler von Infors HT Modell Orbitron (Bottmingen, Schweiz) bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 0,9 kultiviert. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 3.200 x g in einer Tischzentrifuge UNIVERSAL 320R von Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) geerntet, zweimal in 80 mL gekühltem und sterilem destilliertem Wasser gewaschen und das Pellet in 20 mL einer auf Eis gekühlten 10% Glycerol-Lösung gelöst. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen final in 0,8 mL 10 % Glycerol-Lösung gegeben, in 40 µL Portionen aufgeteilt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

#### **Dialyse von DNA-Lösungen**

Vor einer Elektroporation wurde mit der zu transformierenden DNA-Lösung zunächst eine Dialyse durchgeführt, um die Salze aus der Lösung, in der die Plasmid-DNA vorlag, zu entfernen. Dazu wurden 20 mL H<sub>2</sub>O dest. in eine Petrischale gefüllt und eine Nitrocellulosemembran (0,22 µm Porengröße) auf die Wasseroberfläche gelegt. Die DNA-Lösung wurde darauf pipettiert und für 20 min inkubiert.

#### **Transformation mittels Elektroporation**

Für die Transformation wurden 40 µL der elektrokompenten Zellen mit 3 µL der dialysierten DNA-Lösung gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω mit einer Pulsdauer von 4,9 bis 5,3 ms. Nach der Zugabe von 950 µL LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln regeneriert und bei 3.200 x g für 5 min in einer Tischzentrifuge MIKRO 200R von Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) geerntet. Das Pellet wurde in 100 µL LB-Medium gelöst und auf eine selektive LB-Agarplatte mit 50 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei

37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien in einer analytischen PCR (Kapitel 2.2.5.2) durch passende Primer auf die Anwesenheit des transformierten Plasmids überprüft.

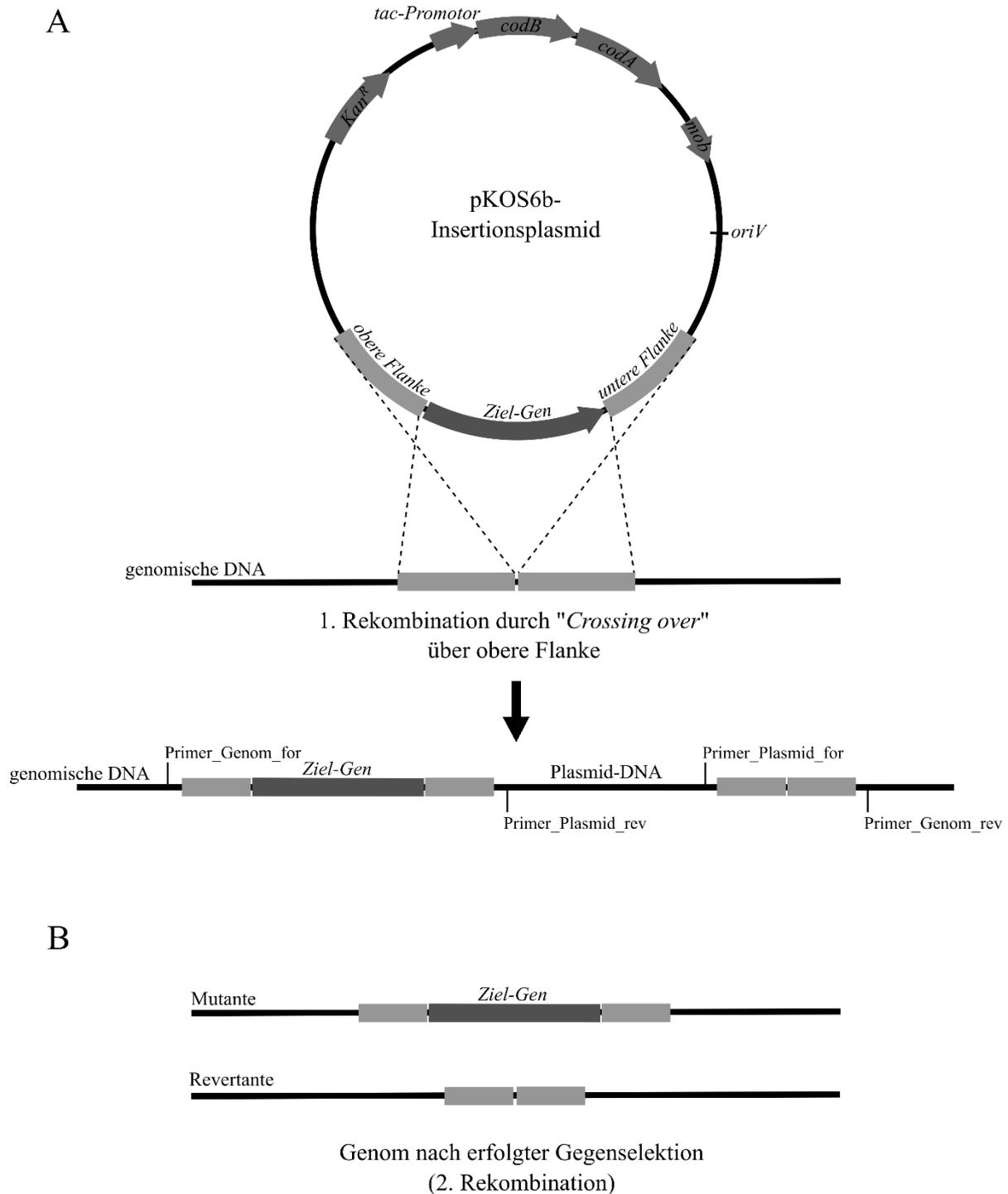
### 2.3.5 Konjugation von *G. oxydans* 621H

Die Konjugation von Plasmiden in *G. oxydans* 621H erfolgte mithilfe des modifizierten „triparentalen matings“ nach Goldberg und Ohman (1984) und Hölscher und Görisch (2006). Die für die Mobilisierung der DNA verantwortlichen *mob*-Gene waren bereits auf den genutzten Ausgangsplasmiden pMM3b und pKOS6b codiert. Das Plasmid pRK2013 des Helferstammes HB101 besaß die zusätzlich benötigten Gene zur Ausbildung des RP4-Apparats. Dieses Plasmid wurde während der Konjugation zunächst vom Helfer- auf den Donorstamm übertragen, wodurch anschließend das gewünschte Plasmid des Donorstammes in *G. oxydans* konjugiert werden konnte.

Sowohl der Donor- und Helferstamm HB101 als auch der Akzeptorstamm von *G. oxydans* 621H wurden, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Hauptkulturen der *E. coli*-Stämme wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1,5 inkubiert. *G. oxydans* 621H Stämme wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und für die Konjugation von Expressionsplasmiden bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 0,9 bzw. für die Konjugation von Insertionsplasmiden bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1,2 kultiviert. Die für die Konjugation optimalen Verhältnisse der einzelnen Stämme wurden nach Peters (2013) berechnet. Bezogen auf 1 mL Zellsuspension entsprach die gewünschte OD<sub>600</sub> für den Donorstamm 0,75, für den Helferstamm 0,8 und für den Akzeptorstamm 3,72. Die benötigten Volumina wurden anhand dessen mit den tatsächlichen OD<sub>600</sub>-Werten berechnet. Die benötigten Mengen an Donor- und Helferstamm wurden bei 3.200 x g für 5 min und 10 °C in einer Tischzentrifuge UNIVERSAL 320 R von Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland) geerntet. Die *E. coli* Zellen wurden in 2 mL VM gewaschen und die berechnete Menge an Akzeptorstamm zugegeben. Die Zellen wurden nochmals geerntet und in 100 µL VM gelöst. Die Zellsuspension wurde auf VM-Agarplatten mit 50 mM Fructose und Thymidin aufgetropft und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden in 300 µL VM von der Agarplatte gelöst und je 100 µL bzw. 200 µL auf VM-Agarplatten mit 50 mM Fructose, 60 µg mL<sup>-1</sup> Cefoxitin, 50 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin und 10 µg mL<sup>-1</sup> Thymidin ausplattiert. Durch die natürliche Resistenz von *G. oxydans* 621H gegenüber Cefoxitin und die auf pMM3b bzw. pKOS6b kodierte Kanamycin-Resistenz konnte eine Selektion auf *G. oxydans* Stämme mit dem konjugierten Plasmid gewährleistet werden. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C bis einzelne Kolonien zu erkennen waren, jedoch maximal für 7 Tage. Die Analyse der gewachsenen Kolonien erfolgte durch eine analytische PCR (Kapitel 2.2.5.2).

### 2.3.6 Markerfreie Insertionen in *G. oxydans* 621H mittels des *codBA*-Systems

Insertionen in das Genom der Multideletionsstämme von *G. oxydans* 621H wurden mithilfe eines markerfreien *codBA*-Deletionssystem realisiert (Kostner et al. 2013). In einem ersten Schritt wurde ein Insertionsplasmid über homologe Bereiche (Flanken), die flankierend *upstream* und *downstream* zum Zielgen lagen, in das Genom integriert. Die pKOS6b-Derivate mit den zu integrierenden DNA-Sequenzen besaßen eine Kanamycin-Resistenz und die für die Konjugation notwendigen *mob*-Gene. Der schematische Aufbau eines pKOS6b-Integrationsvektors, sowie der Ablauf der Integration des Vektors in das Genom von *G. oxydans* 621H und der Gegenselektion sind in Abbildung 2-2 dargestellt. Das Zielgen wurde durch etwa 1 kb lange DNA-Sequenzen flankiert, die homolog zu der Insertionsstelle im Genom waren. Nach einer erfolgreichen Konjugation durch homologe Rekombination mit Kanamycin und Cefoxitin als Selektionsmittel (Kapitel 2.3.5) wurden die isolierten Zellen auf die Integration des pKOS6b-Vektors in den gewünschten Locus hin überprüft. Dazu wurden zwei verschiedene Kombinationen von jeweils einem Genom- und Plasmid-spezifischen Primer gewählt, durch die auch die Flanke, über die die Integration erfolgte, nachgewiesen werden konnte (Abbildung 2-2 A). Nach Bestätigung der Integration wurde eine Gegenselektion mit 5-Fluorocytosine durchgeführt. Dazu wurden die auf pKOS6b enthaltene Genen *codA* und *codB* aus *E. coli* K12, die für eine Cytosin-Deaminase und eine Cytosin Permease kodierten, genutzt. Diese können das fluoridierte Pyrimidin-Analogon 5-Fluorocytosine zu 5-Fluorouracil umwandeln. In einer durch die Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*) katalysierten Folgereaktion entsteht 5-Fluorouridine-monophosphat, welches anschließend zu 5-Fluorodesoxyuridin-monophosphat umgewandelt wird. Dieses löst durch die Inhibition der Thymidylat-Synthase einen toxischen Effekt in der Zelle aus, indem DNA-Reparatur und ihre Replikation irreversibel blockiert sind (Kostner et al. 2013). Durch die Verwendung von BP.8 und BP.9 Stämmen als Akzeptorstämme (Peters et al. 2013) wurde die Gegenselektion zwar wie von Kostner et al. beschrieben durchgeführt, allerdings wurde durch das fehlende *upp*-Gen in den Multideletionsstämmen das gebildete 5-FU nicht durch die Uracil Phosphoribosyl Transferase zu 5-Fluorouridinmonophosphat umgewandelt. Durch eine Erhöhung der Anzahl an getesteten Kolonien konnten nach einer „Gegenselektion“ nach Kostner et al. (2013) dennoch Insertionsmutanten isoliert werden. Die hierfür eingesetzten Medien sind in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. Nach bestätigter Integration wurden für eine Gegenselektion zunächst wenige Zellen mit einer Impfflöse steril entnommen, in 1 mL VM gelöst und eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-5}$  angelegt. Jeweils 100  $\mu$ L der Verdünnungen  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$  wurden auf festen Gegenselektionsmedien (VMmod Var3 oder VMmod Var5) plattiert und bis zu 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Je nach dem, über welche Flanke die Exzision des pKOS6b-Plasmids erfolgte, erhielt man in Folge eine Revertante mit der chromosomalen DNA des verwendeten Empfängers oder eine Mutante mit der gewünschten genetischen Modifikation (Abbildung 2-2 B). Die Überprüfung der generierten Mutanten erfolgte durch analytische PCR und Sequenzierung.



**Abbildung 2-2.** Schematischer Aufbau des pKOS6b-Vektors und Ablauf der 1. und 2. Rekombination zur markerfreien Integration von Genen in *G. oxydans* 621H. A) Aufbau des pKOS6b-Plasmids mit dem Ablauf der homologen Rekombination über die obere Flanke (oben) und das in Folge der Rekombination im Genom integrierte pKOS6b-Plasmid mit den Primern zur Überprüfung der Integration. B) Genomische DNA nach Exzision der Plasmid-DNA durch Gegenselektion mit 5-Fluorouracil. Je nach Flanke, über die die Plasmid-DNA rekombiniert, entsteht in der Folge eine Mutante, in der das Ziel-Gen integriert wurde, oder eine Revertante, die wieder die ursprüngliche chromosomale DNA aufweist. Nach Kostner (2013).

### 2.3.7 Vorbereitung ruhender Zellen von Essigsäurebakterien

Ruhende Zellen von *G. oxydans* 621H und anderen Acetobacteraceae aus der lehrstuhlinterne Stammsammlung wurden für Ganzzell-DCPIP-Assays zur Aktivitätsbestimmung von membranständigen Dehydrogenasen oder auch für Biotransformationsexperimente mit verschiedenen Substraten eingesetzt. Durch die Nutzung von ruhenden Zellen wurden Substrate nicht für die Bildung von Biomasse aufgebraucht, sondern waren vollständig für die Oxidation durch membranständige Dehydrogenasen verfügbar.

Die Herstellung der ruhenden Zellen erfolgte nach Herrmann et al. (2004). Dazu wurden Vor- und Hauptkulturen der *G. oxydans*- bzw. Acetobacteraceae-Stämme kultiviert (Kapitel 2.3.2.2) und die OD bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Für die folgenden Versuche wurde, wenn nicht anders beschrieben, eine  $OD_{600}$  von 4 in einem vorgegebenen Volumen eingestellt. Dazu wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge UNIVERSAL 320 R von Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland) bei  $3.200 \times g$  für 5 min bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  geerntet und zweimal in 8 bis 10 mL 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5) gewaschen. Der Phosphatpuffer nach Sørensen wurde mit 66,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hergestellt. Bei einer Zellanzucht und Biotransformationen in 96-Well Mikrotiterplatten wurden die Zellen mit 200  $\mu\text{L}$  des verwendeten Phosphatpuffers gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in dem gewünschten Puffer und dem gewünschten Volumen gelöst und konnten für weitere Versuche verwendet werden.

### 2.3.8 Biotransformationen mit ruhenden Zellen

Biotransformationen mit ruhenden Zellen in 100 mL- oder 250 mL- Erlenmeyerkolben mit Schikanen der Firma Ochs (Bovenden – Lengler, Deutschland) erfolgten mit 10 % Füllvolumen. Die Vorbereitung der ruhenden Zellen wurde in Kapitel 2.3.7 beschrieben. Die Biotransformationen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Phosphatpuffer nach Sørensen mit 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 5 (Kapitel 2.3.7) mit einer  $OD_{600}$  von 0,4 und einer Substratkonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  bis zu 48 h bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 180 rpm inkubiert. Der Phosphatpuffer nach Sørensen wurde mit 66,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hergestellt. Während der Biotransformation erfolgte die Probennahme von 1 mL alle 2 h unter sterilen Bedingungen. Die Proben wurden 1 min bei  $11.000 \times g$  in einer Tischzentrifuge MIKRO 200R von Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert und bis zur analytischen Auswertung mittels HPLC bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Bei Biotransformationen in 96-Well Mikrotiterplatten mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  Substratkonzentration und 200  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen wurde ein Phosphatpuffer nach Sørensen mit 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kapitel 2.4.1) oder ein Puffer mit 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  und  $0,2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$  verwendet (Burger et al. 2019). Der pH-Wert des 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffers wurde mit 1 M HCl eingestellt. Die Mikrotiterplatte wurde über 24 h bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 180 rpm inkubiert und 100  $\mu\text{L}$  Probenvolumen nach 24 h entnommen, die zur weiteren Analyse diente.

## 2.4 Analytik

### 2.4.1 Ganzzell-DCPIP-Assay zur Aktivitätsbestimmung von membranständigen Dehydrogenasen

Für die Aktivitätsbestimmung von membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien wurde ein Ganzzell-DCPIP-Assay genutzt, der von Peters et al. (2013) beschrieben wurde. Der Assay basiert auf dem Prinzip einer artifiziellen Atmungskette, bei der Elektronen über Phenazinmethosulfat (PMS) auf den terminalen Elektronenakzeptor 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) übertragen werden (Izai et al. 1992). Dabei wird das DCPIP reduziert, was durch eine Änderung der Absorption bei 530 nm photometrisch verfolgt werden kann. Durch die Lage der membranständigen Dehydrogenasen im Periplasma können die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen von PMS auf das DCPIP übertragen werden und somit die Aktivität der Enzyme gemessen werden. Bei 530 nm und pH 5 wurde von einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $7200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ausgegangen und angenommen, dass 1  $\mu\text{mol}$  reduziertes DCPIP je 1  $\mu\text{mol}$  oxidiertem Substrat entsprach (Peters 2013).

Für die Ganzzellkatalyse in einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden ruhende Zellen eingesetzt (Kapitel 2.3.7). Die Reaktionslösung wurde mit 130  $\mu\text{M}$  PMS und 195  $\mu\text{M}$  DCPIP in 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 5 oder McIlvaine Puffer mit pH 4 in einem Gesamtvolumen von 17,5 mL vorbereitet. Der Phosphatpuffer nach Sörensen mit pH 5 wurde mit 66,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hergestellt. Der McIlvaine Puffer mit pH 4 beinhaltet 77,1 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  und 61,5 mM Citronensäure. Je 170  $\mu\text{L}$  der Lösung und 10  $\mu\text{L}$  der ruhenden Zellen (Kapitel 2.3.7) wurden in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  einer 250 mM Substratlösung gestartet und die Platte mit einer transparenten Easyséal™ Abdeckfolie (79x135 mm) von Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) versiegelt. Die Absorption bei 530 nm wurde über 2 h und 30 °C in einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar® Nano von BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Deutschland) verfolgt. Zwischen den Messpunkten alle 2 min wurde die Mikrotiterplatte mit 500 rpm geschüttelt.

### 2.4.2 Modifizierter Seliwanoff-Test zum spezifischen Nachweis von Ketohexosen

Die Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen gegenüber 5-Keto-D-Gluconat wurde mithilfe eines modifizierten Seliwanoff-Tests ermittelt. Der Test wurde nach Theodor Seliwanoff benannt und dient der Unterscheidung von Aldohexosen und Ketohexosen (Seliwanoff 1887). Er konnte daher zum Nachweis von Ketohexosen und deren Derivaten verwendet werden.

Die Herstellung der ruhenden Zellen und die Durchführung von Biotransformationen wurde bereits beschrieben (Kapitel 2.3.7 und 2.3.8). 100  $\mu\text{L}$  Probenlösung wurden aus den Biotransformationen entnommen und mit 50  $\mu\text{L}$  HCl (37 %) und 20  $\mu\text{L}$  einer 5 %igen Resorcinol-Lösung (in Ethanol) in

PCR-Reaktionsgefäßen gemischt. Der Ansatz wurde in einem FlexCycler von Analytik Jena (Jena, Deutschland) für 10 min bei 98 °C erhitzt. 100 µL des erhitzten Ansatzes wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt und die Absorption je nach Ketohexose bei 404 nm oder 480 nm in einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar® Nano von BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Deutschland) bestimmt. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichgerade mit Konzentrationen der Ketohexose zwischen 0 g L<sup>-1</sup> und 20 g L<sup>-1</sup>.

### 2.4.3 HPLC Analyse

Zur Analyse der Substratumsetzung in Biotransformationsexperimenten und der resultierenden Oxidationsprodukte wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) genutzt. Die HPLC-Analyse erfolgte mithilfe des AZURA® Analytical HPLC System von Knauer (Berlin, Deutschland) bestehend aus dem Autosampler Optimas, Column Thermostat Azura CT2.1 und dem RI Detektor RefractoMax 520 der ERC GmbH (Riemerling, Deutschland). Standards wurden in den Konzentrationen 1 g L<sup>-1</sup> und 5 g L<sup>-1</sup> in den jeweils verwendeten Eluenten gelöst und durch Watte in HPLC Vials filtriert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Eichgeraden zur Quantifizierung der verschiedenen Zuckeralkohole, Zucker und Säuren mit Mengen an Standards zwischen 5 µg und 200 µg erstellt. Die untersuchten Proben wurden ebenfalls in dem verwendeten Eluenten 1:10 (v/v) verdünnt und durch Watte in HPLC Vials filtriert. Zur Analyse der verdünnten Proben wurden Injektionsvolumina von 50 µL eingesetzt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der ClarityChrom® Prep 5.0.3.192 Software.

#### Analyse von *meso*-Erythritol und Erythrulose

Für die Quantifizierung von *meso*-Erythritol und L-Erythrulose wurde eine Vertex Plus Säule Eurospher II 100-3 NH<sub>2</sub> (250 x 3 mm) mit integrierter Vorsäule genutzt. Die Elution erfolgte isokratisch mit 80 % Acetonitril (v/v) als Laufmittel mit einer Flussrate von 1 mL min<sup>-1</sup> bei 30 °C. Die Elution von L-Erythrulose erfolgte nach etwa 3 min die von *meso*-Erythritol nach etwa 5 min.

#### Analyse von Glucose und ihrer Oxidationsprodukte

Glucose, Gluconat, 2- und 5-Ketogluconat wurden mithilfe der Luna® NH<sub>2</sub> Säule (100 Å, 3 µm, 150 x 3 mm) mit einem SecurityGuard™ Systems von Phenomenex (Torrance, USA) quantifiziert. Die Elution erfolgte ebenfalls isokratisch mit 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bei pH 3,5 mit einer Flussrate von 0,4 mL min<sup>-1</sup> bei 30 °C. Der pH-Wert der Elutionslösung wurde durch 25 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eingestellt. D-

Glucose wurde nach 2 min, D-Gluconat nach 7 min, 5-Keto-D-Gluconat nach 10 min und 2-Keto-D-Gluconat nach 12 min detektiert.

#### **2.4.4 NMR-Spektroskopie**

Für die Analyse der Oxidationsprodukte von membranständigen Dehydrogenasen wurden, wenn nicht anders beschrieben, Biotransformationen mit 1 mL Probenvolumen in 2 mL-Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss durchgeführt, um eine Verringerung der Substrat- bzw. Produktkonzentration aufgrund von Diffusion zu verhindern. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Methode. Die Proben in 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 5 enthielten, wenn nicht anders beschrieben, 50 mM Substrat und eine Zellkonzentration von  $\text{OD}_{600} = 0,4$ . Der Phosphatpuffer nach Sörensen wurde mit 66,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hergestellt. Die Anzahl der vorbereiteten Proben á 1 mL Probenvolumen richtete sich nach der Anzahl an Messpunkten. Die Proben wurden in 15 mL-Röhrchen vorbereitet und entsprechend der Anzahl an Messpunkten auf 2 mL-Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 250 rpm über 24 h. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 11.000 x g in einer Tischzentrifuge MIKRO 200R von Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) abgetrennt und 500 µL des Probenvolumens in ein neues 2 mL-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss überführt. Die Lagerung bis zur analytischen Auswertung mittels NMR-Spektroskopie erfolgte bei -20 °C. Die Analyse der Oxidationsprodukte der membranständigen Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien durch NMR-Spektroskopie erfolgte am Lehrstuhl für Molekulare Sensorik (TUM) nach der durch Frank et al. (2014) beschriebenen Methode.

#### **2.4.5 Bestimmung der Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber *E. coli* und *S. aureus***

##### **2.4.5.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in Flüssigkulturen**

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet die kleinste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, bei der kein Wachstum eines Mikroorganismus zu verzeichnen ist. Diese Methode wurde genutzt, um die Auswirkung einer Oxidation von Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien auf deren Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Mikroorganismen zu untersuchen.

Die MHK in Flüssigkulturen wurde in 96-Well Mikrotiterplatten mit 200 µL Füllvolumen bestimmt. Dazu wurden Flüssigkulturen von *E. coli* K12 oder *S. aureus* DSM 20232, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, über Nacht kultiviert und die Zelldichte in 25 mL des verwendeten Mediums auf

$OD_{600} = 0,1$  für *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 eingestellt. Je 180  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension wurden in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorgelegt und je 20  $\mu\text{L}$  einer Antibiotikallösung in steigender Konzentration zugegeben. Die Platte wurde mit einer sterilen AeraSeal™ Folie von Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) verschlossen, um Sterilität und Gasaustausch während des Versuchs zu gewährleisten. Die Kulturen wurden über 30 h bei 30 °C und 500 rpm in einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar® Nano von BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Deutschland) inkubiert und das Wachstum durch Messung der Zelldichte bei einer Wellenlänge 600 nm in einem Abstand von 30 min über den gesamten Zeitraum verfolgt. Die minimale Hemmkonzentration entsprach der geringsten Antibiotika-Konzentration, bei der kein Wachstum zu verzeichnen war.

#### 2.4.5.2 Plattendiffusionstest

Der Plattendiffusionstest diente als zweite Methode, um die Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber verschiedenen Mikroorganismen bzw. die Auswirkung einer Oxidation durch membranständige Dehydrogenasen auf deren Wirksamkeit zu testen.

Dazu wurden Overlay-Agarplatten mit LB-Agarplatten als Grund-Agar verwendet, die mit 3 mL Keimschicht-Agar überschichtet wurden. Der Keimschicht-Agar entsprach einem LB-Agar mit nur 0,75 % Agar-Anteil. Nach dem Autoklavieren wurde der auf 45°C-temperierte Agar mit einer Flüssigkultur von *E. coli* K12 oder *S. aureus* DSM 20232, die über Nacht kultiviert wurde (Kapitel 2.3.2.2), auf eine  $OD_{600}$  von 0,01 angeimpft und je 3 mL des Keimschicht-Agars auf dem Grund-Agar gleichmäßig verteilt. Sterile Filterplättchen wurden je nach Anzahl der Proben kreisförmig auf den Overlay-Agarplatten platziert und je 20  $\mu\text{L}$  einer Antibiotika-Lösung in steigender Konzentration bzw. Proben-Lösung auf die Filterplättchen gegeben. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Bestimmung des Hemmhof-Durchmessers für die eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen.

## 2.5 *In silico* Methoden

### 2.5.1 Identifizierung von membranständigen Dehydrogenasen

DNA- und Proteinsequenzen potenzieller membranständiger Dehydrogenasen wurden mithilfe verschiedener Datenbanken und bioinformatischer Anwendungen zur Vorhersage von Proteinstrukturen analysiert und die resultierenden Informationen kombiniert, um eine Unterscheidung zwischen membranständigen Dehydrogenasen und cytoplasmatischen Dehydrogenasen zu gewährleisten. Im Folgenden sind die dafür verwendeten Datenbanken und Anwendungen aufgeführt. Eine Liste aller identifizierter membranständiger Dehydrogenasen und deren *in silico* Eigenschaften findet sich in Tabelle 6-1.

#### **BLAST – NCBI**

Die BLAST-Anwendung (Basic local alignment search tool) vergleicht DNA- oder Proteinsequenzen mit Sequenzen verschiedener Datenbanken aufgrund von Regionen lokaler Ähnlichkeit und bewertet die Treffer aufgrund statistischer Signifikanz (Altschul et al. 1990; Johnson et al. 2008). Der Zugang erfolgte über die NCBI BLAST Homepage (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Für BLASTn-Alignments wurde die „nucleotide collection“ (nt) mit der GenBank EMBL, DDBJ und PDB Sequenzdatenbank, für BLASTp-Alignments wurde die translatierte Datenbank „nr“ verwendet.

#### **SignalP**

Die webbasierte Anwendung SignalP v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) verwendet eine Kombination verschiedener artifizieller neuronaler Netzwerke und identifizierte ein Signalpeptid in einem Protein, sowie dessen Lokalisation und dessen Schnittstelle in der Proteinsequenz (Nielsen et al. 1997; Petersen et al. 2011).

#### **TMHMM**

TMHMM Version 2.0 ist eine Methode zur Vorhersage von Transmembranhelices, die auf einem „hidden Markov model“ basiert, und gibt die Bereiche transmembraner Regionen in Proteinen an (Krogh et al. 2001). Die Anwendung wurde webbasiert verwendet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

## **PSORT-B**

Die online basierte Anwendung PSORT-B Version 3.0.2 (<https://www.psort.org/psortb/>) ermöglichte eine Vorhersage der subzellulären Lokalisation eines Proteins innerhalb einer Bakterienzelle (Gardy 2003; Yu et al. 2010). Dabei werden verschiedene Methoden z.B. zur Identifizierung von Transmembranhelices oder Signalpeptiden verwendet und miteinander kombiniert, um präzise Ergebnisse zu liefern.

## **InterproScan**

Interpro ist eine Datenbank, die einen Überblick über Proteinfamilien und -domänen gibt, indem sie prognostische Informationen über Proteinfunktionen aus verschiedenen Quellen vereint (Finn et al. 2017). Eine Proteinsequenz einer putativen membranständigen Dehydrogenase wurde durch die webbasierte Verwendung von InterproScan Version 5 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) mit einem *scanning* Algorithmus auf Einträge typischer Domänen bekannter membranständiger Dehydrogenasen in der Interpro-Datenbank hin überprüft (Jones et al. 2014).

## **Pfam**

Pfam ist eine Datenbank mit Proteinfamilien und -domänen, die durch multiple Sequenzalignments über „hidden Markov Modelle“ erstellt wurde (Finn et al. 2014). Für jede Pfam-Familie wird eine Architektur der Domänen, bekannte Proteinstrukturen, sowie *Repeats* und Proteinmotive angegeben. Zur Identifikation von membranständigen Dehydrogenasen waren vor allem die Bindedomänen für Kofaktoren wie FAD und PQQ entscheidend.

### **2.5.2 Sequenzanalysen und -alignments**

Sequenzalignments wurden mithilfe der webbasierten Anwendung ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) unter Standardeinstellungen berechnet, welches „seeded guide trees“ und HMM Profil-Profil Techniken für Protein-Alignments verwendete (Sievers et al. 2011). Für eine bessere Darstellung und Auswertung der Alignments diente das Anzeigeprogramm Jalview Version 2.10.5 (Waterhouse et al. 2009).

Phylogenetische Bäume wurden mithilfe der Anwendung MEGA X (Version 10.0.5) erstellt (Kumar et al. 2018). Zunächst wurden Alignments anhand des ClustalW-Algorithmus berechnet und anschließend

phylogenetische Bäume auf Grundlage der Alignments mithilfe der „Maximum Likelihood“ Methode unter Standardeinstellungen berechnet.

### **2.5.3 Proteinstruktur-Modellierung membranständiger Dehydrogenasen**

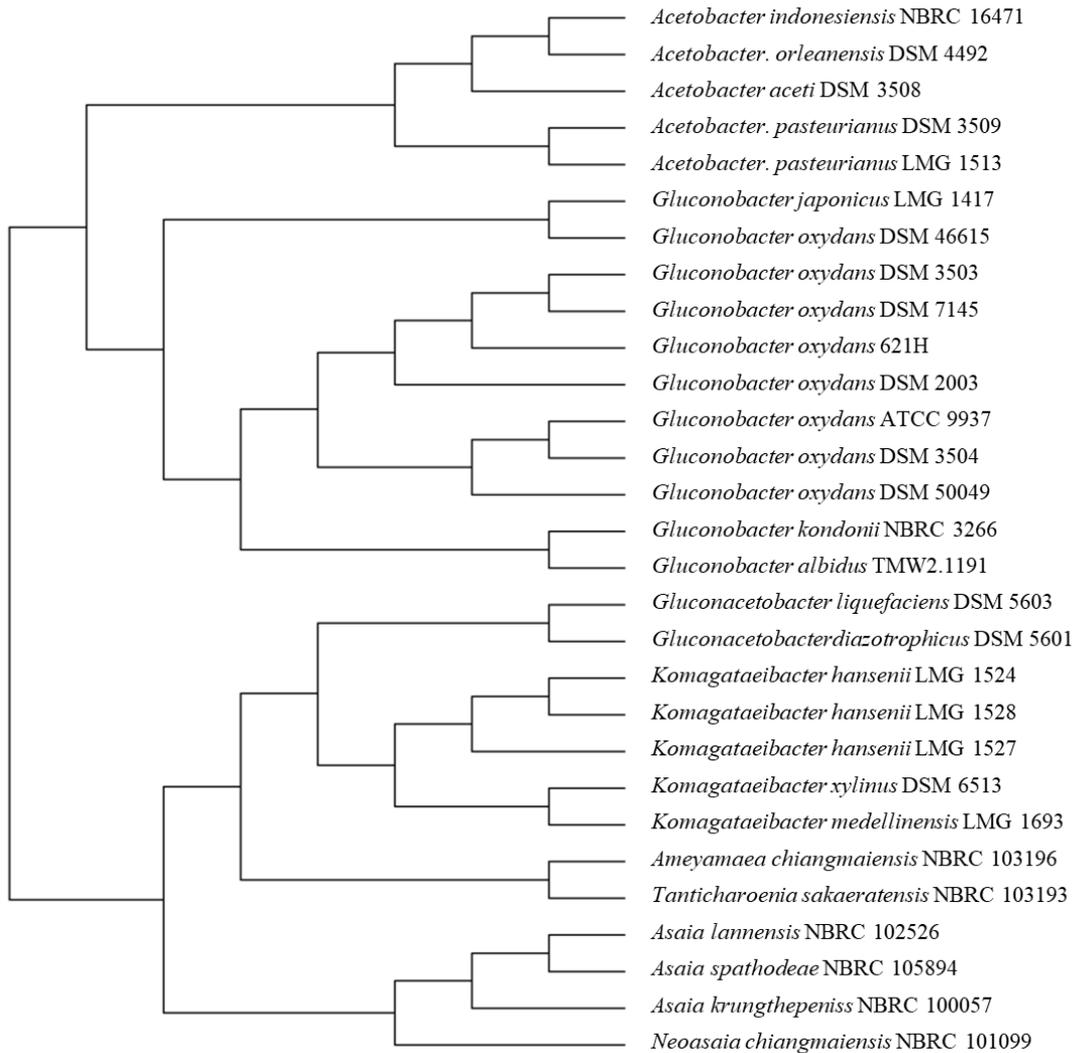
Modelle von membranständigen Glucose- und Polyol Dehydrogenasen wurde mit dem RaptorX Webserver aus Aminosäuresequenzen der Enzyme erstellt (<http://raptorx.uchicago.edu/>; Källberg et al. 2012). Die Darstellung und der Vergleich der erhaltenen Modelle erfolgten mit dem Programm PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stammsammlungsscreening zur Charakterisierung des Oxidationspotenzials membranständiger Dehydrogenasen

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening der lehrstuhlinterne Stammsammlung an Essigsäurebakterien mit Ganzzell-DCPIP-Assays durchgeführt (Kapitel 2.4.1) und ihre oxidative Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten bestimmt. Dadurch konnte das Oxidationspotenzial der membranständigen Dehydrogenasen in den vorhandenen Stämmen eingeschätzt und geeignete Enzyme für gewünschte Umsetzungen identifiziert werden. Getestet wurden industriell bedeutende Verbindungen wie *meso*-Erythritol und dessen Oxidationsprodukt L-Erythrose, welches als Bestandteil in Selbstbräunern eingesetzt wird (Whistler und Underkofler 1938; Pan et al. 2016), sowie D-Glucose und D-Gluconat, die für die Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat – einer Vorstufe von Vitamin C – von Bedeutung sind (Kheshgi et al. 1954; Ano et al. 2011). Da viele dieser Reaktionen durch Polyol Dehydrogenasen katalysiert werden, wurde zusätzlich D-Mannitol als Indikator für die Aktivität dieses Enzyms in den Tests verwendet. Außerdem wurde die Oxidationsaktivität gegenüber D-Fruktose bestimmt, da dieses zu 5-Ketofruktose oxidiert wird, welches als potenzieller Zuckerersatzstoff mit geringem Kaloriengehalt eingesetzt werden könnte (Hoffmann et al. 2020). Die Substrate wurden in einer Konzentration von 25 mM eingesetzt. Alle getesteten Stämme wurden in Tabelle 2-2 aufgelistet. Die Stämme wurden zur Auswertung anhand ihrer 16S-rRNA Sequenzen mithilfe des Programms MEGA X nach ihren phylogenetischen Beziehungen geordnet (Kapitel 2.5.2). Der resultierende phylogenetische Baum aus allen Stämmen mit verfügbarer 16S rRNA-Sequenz ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Stämme, für die keine 16S rRNA-Sequenz zur Verfügung stand, wurden in der Auswertung gemäß ihrem Genus oder ihrer Spezies zugeordnet.

In vorherigen Studien mit Multideletionsstämmen von *G. oxydans* 621H wurden bei Aktivitätsmessungen in Ganzzell-DCPIP-Assays für einzelne Substrate Aktivitäten bis zu 25  $\mu$ Units nachgewiesen, die bei Assays mit Membranfraktionen nicht auftraten (Peters 2013). Diese geringen Aktivitäten wurden daher als unspezifische Schwankungen interpretiert. Deshalb wurde in allen folgenden Ganzzell-DCPIP-Assays ein Schwellenwert von 25  $\mu$ Units für eine tatsächliche Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays festgelegt. Die Ergebnisse der einzelnen Stämme wurden vier Gruppen zugeordnet (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter* und *Asaia*) und in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die höchsten Aktivitäten gegenüber D-Mannitol wurden mit *Komagataeibacter* (*K.*) *medellinensis* LMG 1693 mit 184  $\mu$ Units und *K. europaeus* UMCC 1744 mit 172  $\mu$ Units erreicht. *K. hansenii* LMG 1527 und *Asaia* (*As.*) *lannensis* NBRC 102526 zeigten für *meso*-Erythritol die besten Umsetzungen mit 142  $\mu$ Units bzw. 126  $\mu$ Units und gleichzeitig eher mittlere Aktivität gegenüber L-Erythrose, dem Oxidationsprodukt von *meso*-Erythritol



**Abbildung 3-1.** Phylogenetischer Baum der Acetobacteraceae aus der lehrstuhlinternen Stammsammlung erstellt aus 16S rRNA Sequenzen. Verwendet wurde das Programm MEGA X (Version 10.0.5) mit dem ClustalW Algorithmus zur Erstellung eines Sequenzalignments, sowie die „Maximum Likelihood“ Methode zur Berechnung des phylogenetischen Baumes.

(54  $\mu$ Units bzw. 48  $\mu$ Units). Die höchste Aktivität gegenüber L-Erythrose von 302  $\mu$ Units wurde mit *Ameyamaea (Am.) chiangmaiensis* NBRC 103196 gemessen. Gegenüber D-Fructose zeigte *As. krungthepensis* NBRC 100057 mit 119  $\mu$ Units das höchste Oxidationspotenzial. Bei D-Glucose überstiegen drei Stämme den Wert von 500  $\mu$ Units: *G. cerinus* Isolat 2 (550  $\mu$ Units), *K. europaeus* UMCC 1744 (526  $\mu$ Units) und *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 (532  $\mu$ Units). *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 erreichte außerdem die höchste Aktivität gegenüber D-Gluconat mit 934  $\mu$ Units.

**Tabelle 3-1.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener Acetobacteraceae in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber verschiedenen Substraten

	D- Mannitol	<i>meso</i> - Erythritol	L-Erythru- lose	D- Fructose	D- Glucose	D- Gluconat
<b>Acetobacter-Gruppe</b>						
<i>A. indonesiensis</i> NBRC 16471	30±11	6±11	58±28	12±14	27±15	3±2
<i>A. orleanensis</i> DSM 4492	50±10	12±13	86±9	13±16	258±68	16±22
<i>A. aceti</i> DSM 3508	21±25	33±26	43±19	2±3	154±25	40±29
<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	46±34	0±0	85±26	55±21	88±64	81±54
<i>A. pasteurianus</i> LMG 1513	18±18	7±13	14±14	5±6	104±7	0±0
<i>A. pasteurianus</i> UMCC1733	76±37	72±39	128±41	31±18	272±66	31±5
<i>A. pasteurianus</i> UMCC1786	19±18	3±5	27±27	16±2	29±30	34±34
<i>A. pasteurianus</i> B803	38±15	6±6	13±16	5±9	389±159	142±106
<i>Acetobacter species</i> B945	15±19	16±25	11±18	44±17	59±38	15±15
<b>Gluconobacter-Gruppe</b>						
<i>G. cerinus</i> Isolat 1	61±21	64±20	78±37	57±24	276±118	62±8
<i>G. cerinus</i> Isolat 2	34±24	29±28	36±27	48±22	550±75	91±45
<i>G. cerinus</i> Isolat 3	29±33	62±50	43±30	63±50	100±75	88±81
<i>G. japonicus</i> LMG 1417	71±15	73±32	41±35	24±18	437±326	103±51
<i>G. oxydans</i> DSM 46615	50±23	67±16	111±22	62±18	301±111	98±23
<i>G. oxydans</i> DSM 3503	100±26	116±32	146±30	30±6	310±182	88±47
<i>G. oxydans</i> DSM 7145	94±23	72±27	107±52	49±6	313±105	197±33
<i>G. oxydans</i> 621H	96±37	84±21	50±11	60±25	292±78	296±82
<i>G. oxydans</i> DSM 2003	50±17	85±35	31±12	20±4	286±35	45±4
<i>G. oxydans</i> ATCC 9937	46±3	82±36	37±27	1±1	322±46	79±19
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	80±20	47±21	124±34	26±7	263±46	122±40
<i>G. oxydans</i> DSM 50049	65±37	94±29	112±49	102±26	286±159	346±135
<i>G. oxydans species</i> E22	95±30	43±27	2±2	45±11	423±12	104±47
<i>G. kondonii</i> NBRC 3266	68±49	53±6	78±44	65±17	116±9	132±93
<i>G. albidus</i> TMW2.1191	127±32	57±41	15±33	41±11	334±60	96±43
<i>G. frateurii</i> Isolat	48±17	56±22	70±10	42±20	249±59	123±40
<i>Gluconobacter species</i> .018	152±78	67±29	73±27	12±18	401±102	238±61
<i>Gluconobacter species</i> B789	73±17	34±34	32±38	19±27	222±71	88±34
<i>Gluconobacter species</i> B790	37±11	84±17	118±68	58±6	205±47	99±26
<b>Komagataeibacter-Gruppe</b>						
<i>Ga. liquefaciens</i> DSM 5603	63±8	79±32	28±9	76±40	323±102	176±71
<i>Ga. diazotrophicus</i> DSM 5601	33±13	6±12	30±32	14±13	265±94	21±17
<i>K. hansenii</i> LMG 1524	80±14	38±25	48±12	27±17	365±136	121±33
<i>K. hansenii</i> LMG 1527	80±12	142±20	54±40	51±18	369±38	168±13
<i>K. hansenii</i> LMG 1528	87±11	107±29	94±29	73±48	173±42	±27
<i>K. xylinus</i> DSM 6513	69±17	24±22	29±24	14±13	184±58	166±51
<i>K. xylinus</i> UMCC 2756	55±9	88±88	181±85	50±24	268±81	83±55
<i>K. medellinensis</i> LMG 1693	184±58	26±21	154±36	18±24	449±159	171±45
<i>K. europaeus</i> UMCC 1744	172±52	114±40	126±65	13±12	526±80	44±17
<i>Am. chiangmaiensis</i> NBRC 103196	24±13	118±82	302±176	11±15	115±60	27±36
<i>T. sakaeratensis</i> NBRC 103193	80±37	103±17	67±15	97±27	189±25	186±60
<b>Asaia-Gruppe</b>						
<i>As. lannensis</i> NBRC 102526	25±25	126±55	48±46	35±42	256±9	116±8
<i>As. spathodeae</i> NBRC 105894	45±21	36±16	4±8	56±25	65±29	59±22
<i>As. krungthepensis</i> NBRC 100057	63±15	71±21	37±30	119±13	164±17	96±11
<i>As. bogorensis</i> Isolat	71±20	66±38	60±31	39±39	137±70	58±20
<i>Asaia species</i> B955	26±9	1±2	29±28	8±8	70±19	40±18
<i>N. chiangmaiensis</i> NBRC 101099	11±19	61±20	39±30	52±17	532±43	934±17

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

## 3.2 Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9

Bisher wurden für biotechnologische Anwendungen mit membranständigen Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien Wildtypstämme oder Stämme mit einzelnen Deletionen oder Plasmiden zur Überexpression eingesetzt. Mit diesen können jedoch Neben- und Folgereaktionen aufgrund verschiedener Dehydrogenasen im Periplasma auftreten, die die Effizienz der Katalyse reduzieren. Auch eine genaue Charakterisierung der verwendeten membranständigen Dehydrogenasen bezüglich deren Substratspektren und Affinitäten zu einzelnen Substraten ist aufgrund dessen nicht möglich. Zur Entwicklung von Ganzzellkatalysatoren wurden im Lauf dieser Arbeit verschiedene membranständige Dehydrogenasen im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 exprimiert, in dem alle bekannten membranständigen Dehydrogenasen deletiert wurden. Eine genaue Charakterisierung und eine Einschätzung des Oxidationspotenzials einzelner membranständigen Dehydrogenasen wurde so möglich.

### 3.2.1 Charakterisierung von Polyol Dehydrogenasen

Polyol Dehydrogenasen katalysieren einige industriell bedeutende Oxidationen, wie die Umsetzung von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose oder auch die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus Gluconat. Die Reaktion verläuft dabei nach der Bertrand-Hudson-Regel nach der Polyol Dehydrogenasen Zuckeralkoholen mit sekundäre Alkoholgruppen in der D-Erythro-Konfiguration zu ihren korrespondierenden Ketosen oxidieren (Kerstens et al. 1965; Voss et al. 2010). Untersucht wurden sechs verschiedene Polyol Dehydrogenasen, jeweils zusammengesetzt aus einer großen (*sldA*) und einer kleinen Untereinheit (*sldB*). Die untersuchten Polyol Dehydrogenasen stammten aus fünf verschiedenen Essigsäurebakterien, für die bereits Genomsequenzierungen vorlagen und durch welche eine Identifizierung der *sldAB*-Gene möglich war. Eine Auflistung der Stämme findet sich in Tabelle 2-5. Die *sldAB*-Gene im Genom wurden mithilfe von Datenbanken und bioinformatischer Anwendungen zur Vorhersage von Proteinstrukturen wie beispielsweise Signalpeptiden oder Transmembranhelices identifiziert (Kapitel 2.5.1 und Tabelle 6-1).

### Konstruktion von Expressionsstämmen mit Polyol Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9

Die Expression der Polyol Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9 erfolgte mithilfe des Expressionsplasmids pMM3b. Durch Austausch des ursprünglich vorhandenen *lacZ*-Gens durch die *sldAB*-Gene wurde die Expression der *sldAB*-Gene durch den Promotor der membranständigen Alkohol

Dehydrogenase kontrolliert. Eine Übersicht des Ausgangs-Plasmids pMM3b und eines exemplarischen Expressionsplasmids findet sich im Anhang in Abbildung 6-1. Die Stämme BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pADH-sldAB\_Gal wurden bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben und charakterisiert (Mientus et al. 2017; Gruber 2015). Sie wurden dennoch zu Vergleichszwecken in die Versuche mitaufgenommen. Ebenso war der Stamm BP.9 pADH-sldAB\_med bereits vorhanden (Mientus, unveröffentlichte Daten). Die fehlenden Plasmide wurden durch Ligation des Vektorfragments pMM3b\_V1 mit den etwa 2,6 kb großen *sldAB*-Fragmenten konstruiert. Das Vektorfragment pMM3b\_V1 wurde durch eine präparative PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase mit dem Vektor pMM3b als Template und den Oligonukleotiden pMM3bV1\_for / \_rev generiert (Tabelle 6-2). Die Gene *sldAB1\_3504* (GLS\_RS04720-5), *sldAB2\_3504* (GLS\_RS11880-5) und *sldAB\_hans* (GXY\_RS08335-40) wurden aus dem Genom von *G. oxydans* DSM 3504 und *K. hansenii* LMG 1524 durch eine präparative PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Kapitel 2.2.5.1) amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide *sldAB1\_3504\_for / \_rev*, *sldAB2\_3504\_for / \_rev* und *GXY\_08335\_08340\_for / \_rev* verwendet (Tabelle 6-2). Die Primer besaßen zusätzlich einen Überhang von etwa 20 bp, der komplementär zu dem 3'- bzw. 5'-Ende des Vektorfragments pMM3b\_V1 war und für die anschließende Ligation mit der SLiCE-Klonierungsmethode benötigt wurde (Kapitel 2.2.8). Nach der Ligation folgte eine Transformation der Plasmide in *E. coli* TOP10 oder XL1-blue (Kapitel 2.3.3 und 2.3.4). Nach Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurden das Plasmid durch triparentale Konjugation in den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 übertragen (Kapitel 2.3.5). Die erhaltenen Stämme sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

**Tabelle 3-2.** Erstellte BP.9-Expressionsstämme, die Polyol Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

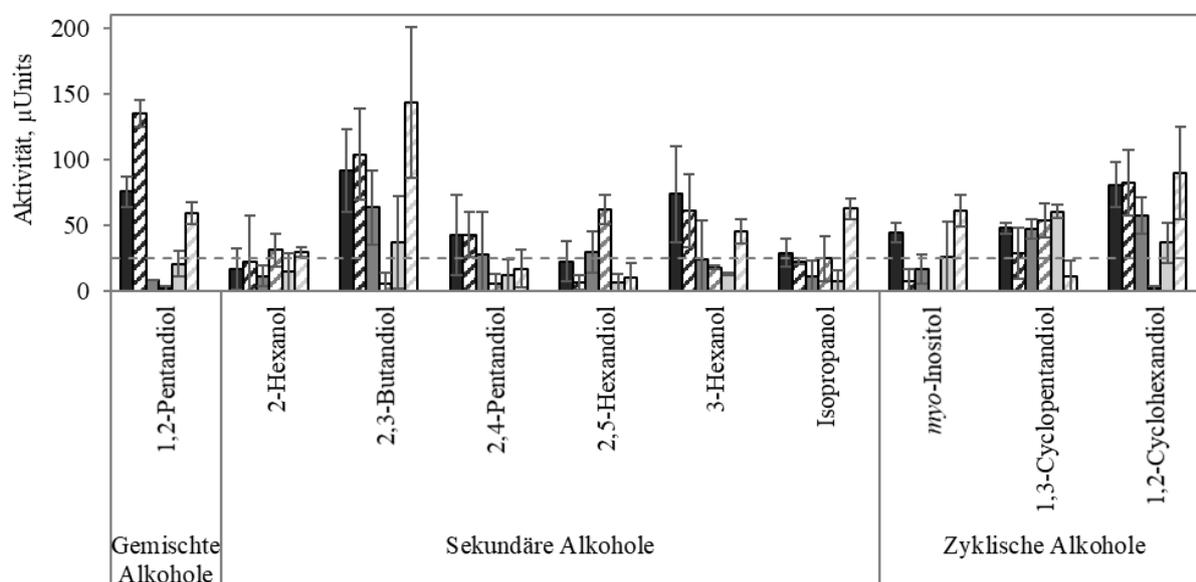
Stamm	Eigenschaften
BP.9 pADH-sldAB1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504
BP.9 pADH-sldAB2_3504	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase 2 (GLS_RS11880-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504
BP.9 pADH-sldAB1_hans	Derivat von pMM3b; Expression der Polyol Dehydrogenase (GXY_RS08335-40) aus <i>K. hansenii</i> LMG 1524

### Charakterisierung der Substratspektren von Polyol Dehydrogenasen

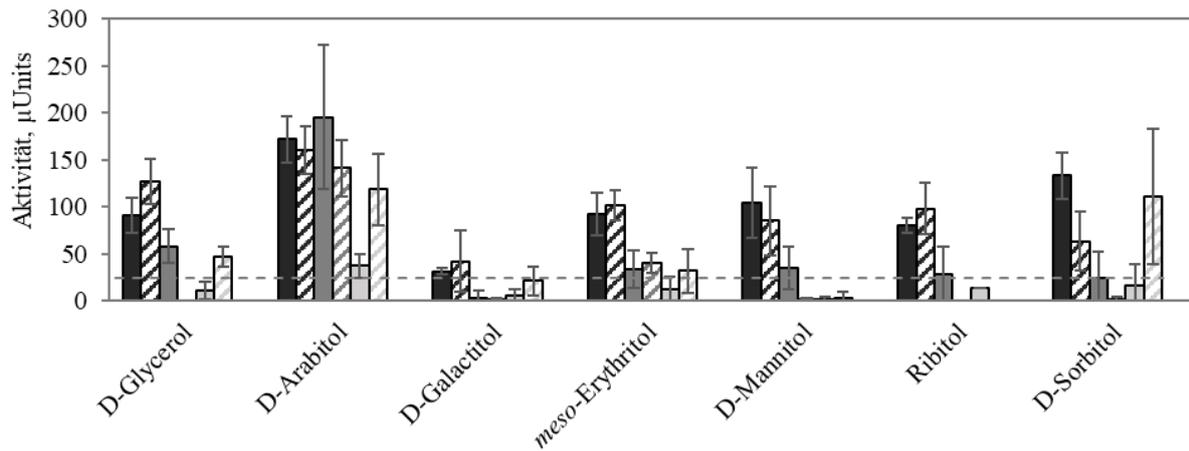
Die Substratspektren der Polyol Dehydrogenasen wurden in Ganzzell-DCPIP-Assays nach Peters et al. (2013) mit sechs Expressionsstämmen charakterisiert, die als einzige membranständige Dehydrogenase eine Polyol Dehydrogenase exprimierten (Kapitel 2.4.1). Durch die Verwendung des Multideletionsstammes BP.9 konnten die Substratspektren fünf bisher uncharakterisierter Polyol Dehydrogenasen

eindeutig bestimmt werden. Abbildung 3-2 bis Abbildung 3-4 zeigen die Ergebnisse der Ganzzell-DCPIP Assays. Getestet wurden insgesamt 43 Substrate zusammengestellt aus primären, sekundären und zyklischen Alkoholen, Zuckeralkoholen, Aldosen, Ketosen, Aldehyden, Disacchariden und Säuren. Eine Liste aller eingesetzten Substrate findet sich in Tabelle 6-4. Dargestellt sind jedoch nur die Substrate, für die mindestens ein Stamm eine oxidative Aktivität oberhalb des Schwellenwertes von 25  $\mu$ Units gezeigt hatte.

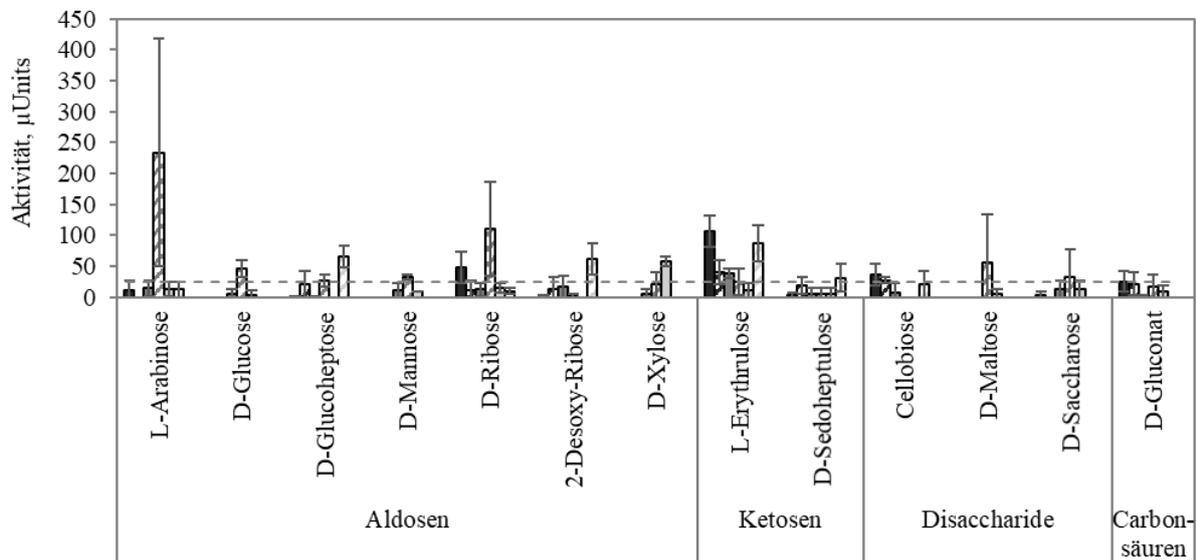
Die getesteten Stämme zeigten Aktivität gegenüber sekundären oder zyklischen Alkoholen, Zuckeralkoholen oder einzelnen Aldosen und Ketosen, sowie D-Gluconat. Allerdings unterschieden sich die Substratspektren und die oxidative Aktivität der Enzyme gegenüber einzelnen Substraten deutlich. Die Polyol Dehydrogenasen SldAB\_621H aus *G. oxydans* 621H und SldAB\_Gal aus *G. albidus* TMW2.119 zeigten ein fast identisches Spektrum mit ähnlichen Oxidationsstärken. SldAB\_621H konnte dabei 19 Substrate oxidieren, darunter auch D-Gluconat mit durchschnittlich 25  $\mu$ Units, dass von keiner anderen hier getesteten Polyol Dehydrogenase mit einer höheren Aktivität umgesetzt wurde. SldAB\_Gal erreichte dagegen bei 15 Substraten eine Aktivität über dem Schwellenwert von 25  $\mu$ Units. Die beiden Enzyme SldAB\_621H und SldAB\_Gal zeigten außerdem mit  $92,7 \pm 22,8 \mu$ Units und  $101,4 \pm 15,9 \mu$ Units die höchsten gemessenen Aktivitäten gegenüber *meso*-Erythritol und oxidierten auch das Disaccharid Cellobiose. Auch die Polyol Dehydrogenase



**Abbildung 3-2.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener Polyol Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber primären, sekundären und zyklischen Alkoholen. ■ BP.9 pMM4a-mSldAB, ■ BP.9 pADH-sldAB\_Gal, ■ BP.9 pADH-sldAB1\_3504, ■ BP.9 pADH-sldAB2\_3504, □ BP.9 pADH-sldAB\_hans, □ BP.9 pADH-sldAB\_med. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von 25  $\mu$ Units.  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{Substrat} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate



**Abbildung 3-3.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) verschiedener Polyol Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Zuckeralkoholen. ■ BP.9 pMM4a-mSldAB, ▨ BP.9 pADH-sldAB\_Gal, ■ BP.9 pADH-sldAB1\_3504, ■ BP.9 pADH-sldAB2\_3504, ▨ BP.9 pADH-sldAB\_hans, ■ BP.9 pADH-sldAB\_med. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate



**Abbildung 3-4.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) verschiedener Polyol Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Aldosen, Ketosen, Disacchariden und Carbonsäuren. ■ BP.9 pMM4a-mSldAB, ▨ BP.9 pADH-sldAB\_Gal, ■ BP.9 pADH-sldAB1\_3504, ▨ BP.9 pADH-sldAB2\_3504, ▨ BP.9 pADH-sldAB\_hans, ■ BP.9 pADH-sldAB\_med. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate

SldAB1\_3504 aus *G. oxydans* DSM 3504 mit 11 oxidierten Substraten besaß ein ähnliches Spektrum wie SldAB\_621H und SldAB\_Gal, jedoch wies sie meist deutlich geringere Aktivitäten auf. SldAB2\_3504, die zweite Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 3504, setzte insgesamt 12 Substrate um, wobei neben Zuckeralkoholen, sekundären und zyklischen Alkoholen auch Aldosen wie L-Arabinose, D-Glucose, D-Glucoheptose, D-Mannose und D-Ribose und die Disaccharide Maltose und Saccharose oxidiert wurden. Damit unterscheidet sich das Substratspektrum der SldAB2\_3504 beträchtlich von denen der anderen Polyol Dehydrogenasen aus *Gluconobacter*. Die Polyol Dehydrogenase aus *K. hansenii* LMG 1524 (SldAB\_hans) verfügte über das kleinste Substratspektrum mit nur sechs Substraten. Darunter fand sich jedoch D-Xylose, das von keiner anderen Polyol Dehydrogenase oxidiert wurde. Auch bei der Polyol Dehydrogenase SldAB\_med aus *K. medellinensis* LMG 1693 wurde – ähnlich wie bei der SldAB2\_3504 – neben der Oxidation von Zuckeralkoholen, sekundären und zyklischen Alkoholen zusätzlich eine Aktivität gegenüber Aldosen und Disacchariden nachgewiesen. SldAB\_med setzte im Assay insgesamt 15 Substrate um, einschließlich Sedoheptulose und 2-Desoxy-Ribose.

Charakterisierungen der Substratspektren von Polyol Dehydrogenasen in vorherigen Studien zeigten ebenfalls hauptsächlich Aktivitäten der Enzyme gegenüber sekundären Alkoholen und Zuckeralkoholen, bei denen die Oxidationen gemäß der Bertrand-Hudson Regel abliefen (Ameyama et al. 1985; Adachi et al. 2001; Sugisawa und Hoshino 2002; Matsushita et al. 2003; Salusjärvi et al. 2004; Lapenaite et al. 2005; Mientus et al. 2017). Bei den hier untersuchten Polyol Dehydrogenasen wurde außerdem neben der Umsetzung von sekundären und zyklischen Alkoholen oder Zuckeralkoholen auch die Oxidation verschiedener Aldosen, Ketosen und Disacchariden nachgewiesen. Besonders die Polyol Dehydrogenase SldAB2\_3504 zeigte hier ein Substratspektrum, das deutlich von dem Substratspektrum der Polyol Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 (SldAB1\_3504) und dem der anderen getesteten Polyol Dehydrogenasen aus *Gluconobacter* abwich.

### 3.2.2 Charakterisierung membranständiger Glucose Dehydrogenasen

Membranständige Glucose Dehydrogenasen katalysieren die Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat, welches den ersten Schritt zur Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat, einer Vorstufe von Vitamin C und L-(+)-Weinsäure, darstellt (Ameyama et al. 1981a). In dieser Arbeit wurden sieben membranständige Glucose Dehydrogenasen aus sechs verschiedenen Essigsäurebakterien-Stämmen charakterisiert. Eine Beschreibung aller Stämme findet sich in Tabelle 2-5. Die Identifizierung der *mgdh*-Gene erfolgte mithilfe von Datenbanken und bioinformatischer Anwendungen zur Vorhersage von Proteinstrukturen (Kapitel 2.5.1 und Tabelle 6-1).

### Konstruktion von Expressionsstämmen mit membranständigen Glucose Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9

Zur genauen Charakterisierung der membranständigen Glucose Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien wurden die *mgdh*-Gene im Multideletionsstamm BP.9 unter Kontrolle des Promotors der membranständigen Alkohol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H exprimiert. Dazu wurden die *mgdh*-Gene in das Plasmid pMM3b anstelle des *lacZ*-Gens integriert. Die Amplifikation des pMM3b-Rückgrats erfolgte durch eine präparative PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Kapitel 2.2.5.1) mit dem Primer-Paar pMM3buniV1\_for / \_rev. Die ca. 2,4 kb großen Gene *mgdh1\_3504* (GLS\_RS01440) und *mgdh2\_3504* (GLS\_RS07240) aus *G. oxydans* DSM 3504, *mgdh\_Gal* (A0U94\_RS08490) aus *G. albidus* TMW2.1191, *mgdh\_hans* (GXY\_RS10465) aus *K. hansenii* LMG 1524, *mgdh\_med* (GLX\_RS03130) aus *K. medellinensis* LMG 1693 und *mgdh\_PA15* (GDI\_RS15540) aus *Ga. diazotrophicus* DSM 5601 wurden durch eine präparative PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase aus genomischer DNA amplifiziert. Als Primer dienten die Oligonukleotide GDH1\_3504\_for / \_rev (*mgdh1\_3504*), GDH2\_3504\_for / \_rev (*mgdh2\_3504*), GAL03ex\_for / \_rev (*mgdh\_Gal*), GXY\_RS10465\_for / \_rev (*mgdh\_hans*), GDH1\_1693\_for / \_rev (*mgdh\_med*) und GDH1\_PA15\_for / rev (*mgdh\_PA15*) (Tabelle 6-2). Durch zusätzliche Überhänge von etwa 20 bp an den verwendeten Oligonukleotiden, die komplementär zu dem 3'- bzw. 5'- Ende des Vektorfragments pMM3b\_V1 waren, wurden die Plasmide anschließend durch die SLiCE-Klonierungsmethode ligiert (Kapitel 2.2.8). Eine Übersicht des Ausgangs-Plasmids pMM3b und eines exemplarischen Expressionsplasmids findet sich in Abbildung 6-1. Nach einer Transformation in *E. coli* (Kapitel 2.3.3) wurden die Plasmide durch triparentale Konjugation auf den Multideletionsstamm BP.9 übertragen (Kapitel 2.3.5) und die Stämme mittels spezifischer PCR-Reaktionen und Sequenzierung verifiziert. Die erhaltenen Stämme sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst

**Tabelle 3-3.** Erstellte BP.9-Expressionsstäme, die membranständige Glucose Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

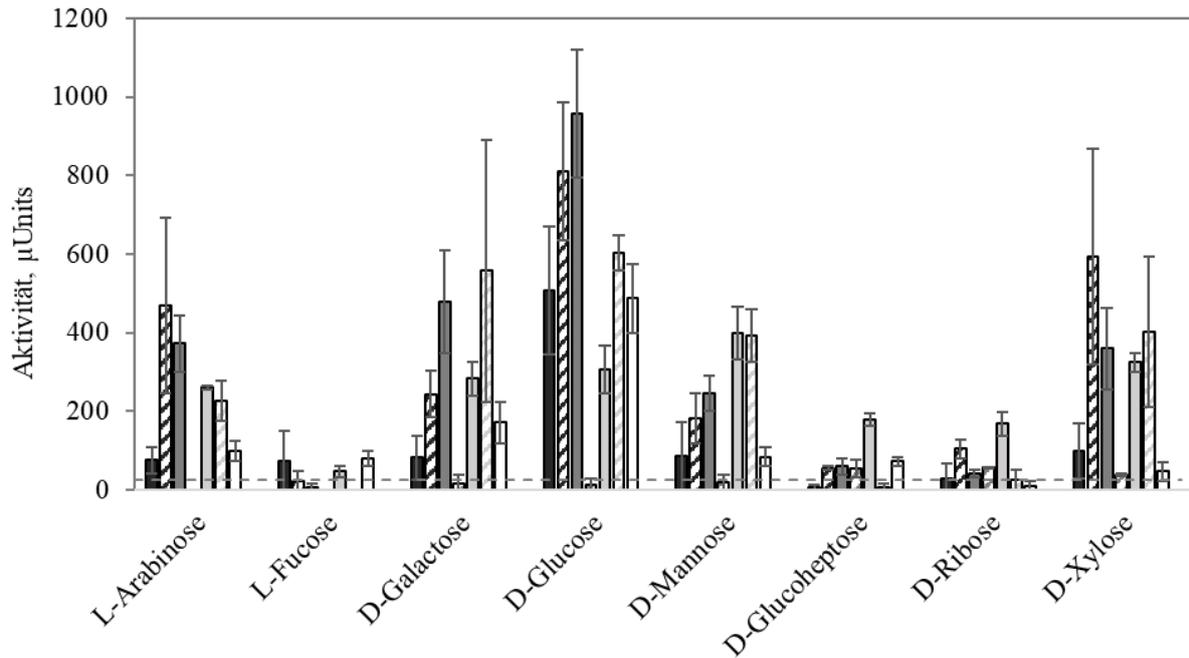
Stamm	Eigenschaften
BP.9 pADH-mGDH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (A0U94_RS08490) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191
BP.9 pADH-mGDH1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase 1 (GLS_c02870) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504
BP.9 pADH-mGDH2_3504	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase 2 (GLS_c14360) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504
BP.9 pADH-mGDH_hans	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GXY_RS10465) aus <i>K. hansenii</i> ATCC 23769

**Fortsetzung Tabelle 3-3.** Verwendete und erstellte BP.9-Expressionsstämme, die membranständige Glucose Dehydrogenasen aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

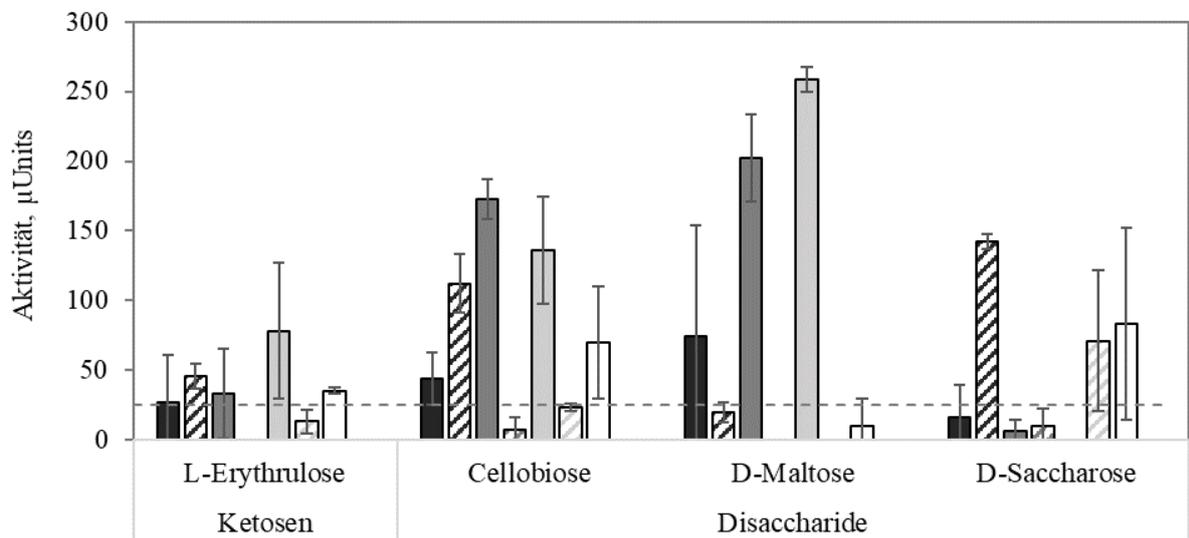
Stamm	Eigenschaften
BP.9 pADH-mGDH_med	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GLX_RS03130) aus <i>K. medellinensis</i> LMG 1693
BP.9 pADH-mGDH_PA15	Derivat von pMM3b; Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenase (GDI_RS15540) aus <i>Ga. diazotrophicus</i> DSM 5601

### Charakterisierung der Substratspektren von membranständigen Glucose Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays

Zur Charakterisierung der membranständigen Glucose Dehydrogenasen wurden Ganzzell-DCPIP-Assays durchgeführt (Kapitel 2.4.1), um die Substratspektren und oxidativen Eigenschaften der Enzyme eindeutig bestimmen zu können. Der Stamm BP.9 pMM4a-mGDH, der die membranständige Glucose Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H exprimierte und bereits von Mientus et al. (2017) charakterisiert wurde, wurde zu Vergleichszwecken ebenfalls in die Analyse integriert. Getestet wurden wie zuvor 43 Substrate aus verschiedenen Substratklassen. Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 zeigen die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen. Dargestellt sind hierbei nur die Substrate, für die mindestens ein Stamm eine oxidative Aktivität oberhalb des Schwellenwertes von 25  $\mu$ Units gezeigt hatte. Eine Liste aller eingesetzten Substrate findet sich in Tabelle 6-4. Es zeigte sich, dass die membranständigen Glucose Dehydrogenasen vor allem Aldosen, Ketosen und Disaccharide oxidierten. Die meisten membranständigen Glucose Dehydrogenasen konnten neun bis elf Substrate oxidieren, jedoch unterschieden sich die spezifischen Aktivitäten und Substratspektren zwischen den Enzymen deutlich (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). Ein breites Substratspektrum mit teilweise sehr hohen Aktivitäten zeigte sich bei den Glucose Dehydrogenasen mGDH\_621H aus *G. oxydans* 621H, mGDH\_Gal aus *G. albidus* TMW2.1191, mGDH1\_3504 aus *G. oxydans* DSM 3504 und mGDH\_hans aus *K. hansenii* LMG 1524. Das Substratspektrum der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H bei Expression im Multideletionsstamm BP.9 wurde bereits von Mientus et al. (2017) beschrieben und deckte sich mit dem hier ermittelten Spektrum der mGDH\_621H. Die höchste Oxidationsaktivität gegenüber D-Glucose mit etwa 950  $\mu$ Units wurde mit der GDH1\_3504 aus *G. oxydans* DSM 3504 erzielt. Die mGDH2\_3504 als zweite membranständige Glucose Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 3504 zeigte nur ein enges Spektrum mit geringer Aktivität gegenüber D-Glucoheptose, D-Ribose und D-Xylose. Die mGDH\_PA15 aus *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15 konnte nur sieben Substrate mit vergleichsweise geringen Aktivitäten umsetzen und unterschied sich zum Teil von dem zuvor von Sará-Paez et al. (2015) beschriebenen Spektrum mit der aus *Ga. diazotrophicus* DSM 5601 isolierten membranständigen Glucose Dehydrogenase.



**Abbildung 3-5.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) verschiedener membranständiger Glucose Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Aldosen. ■ BP.9 pMM4a-mGDH, ▨ BP.9 pADH-mGDH\_Gal, ■ BP.9 pADH-mGDH1\_3504, ▨ BP.9 pADH-mGDH2\_3504, ▨ BP.9 pADH-mGDH\_PA15, ▨ BP.9 pADH-mGDH\_hans, □ BP.9 pADH-mGDH\_med. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate



**Abbildung 3-6.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) verschiedener membranständiger Glucose Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Ketosen und Disacchariden. ■ BP.9 pMM4a-mGDH, ▨ BP.9 pADH-mGDH\_Gal, ■ BP.9 pADH-mGDH1\_3504, ▨ BP.9 pADH-mGDH2\_3504, ▨ BP.9 pADH-mGDH\_PA15, ▨ BP.9 pADH-mGDH\_hans, □ BP.9 pADH-mGDH\_med. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate

### 3.2.3 Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191

Um die Zusammensetzung an membranständigen Dehydrogenasen und die Vielfalt der Substratumsetzungen in einem Stamm zu untersuchen, wurden einige membranständige Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 im Multideletionsstamm BP.9 exprimiert und charakterisiert. *G. albidus* TMW2.1191 oxidierte in den vorherigen Ganzzell-DCPIP Assays außer L-Erythrose alle getesteten Substrate mit – im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen – hohen Aktivitäten (Tabelle 3-1). Zusätzlich lag die Genomsequenz von *G. albidus* TMW2.1191 zu diesem Zeitpunkt bereits vor und ermöglichte eine Identifizierung der Gene von membranständigen Dehydrogenasen. Die Gene wurden mithilfe bioinformatischer Methoden identifiziert und als membranständige Dehydrogenasen bestätigt (Kapitel 2.5.1 und Tabelle 6-1).

#### Konstruktion von Expressionsstämmen mit membranständigen Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191

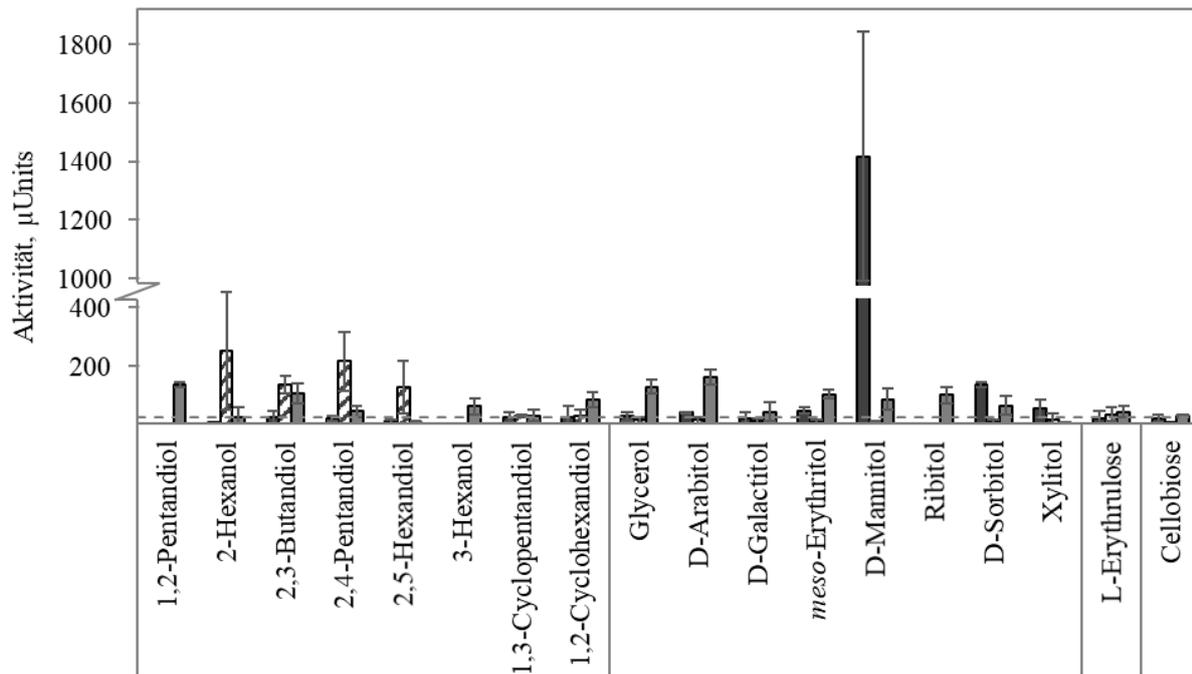
Die Expression der membranständigen Dehydrogenasen erfolgte durch das Plasmid pMM3b, in dem die Gene der Dehydrogenasen das *lacZ*-Gen ersetzen und so unter Kontrolle des Promotors der membranständigen Alkohol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H exprimiert wurden. Dazu wurde das Plasmid-Fragment pMM3b\_V1 aus pMM3b durch eine präparative PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase und pADHuniV1\_for / \_rev als Primer amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1 und Tabelle 6-2). Die Gene der Sorbitol Dehydrogenase (*sdh\_Gal*, A0U94\_RS04580-90), der sekundären Alkohol Dehydrogenase (*sekADH\_Gal*, A0U94\_RS09810) und der uncharakterisierten membranständigen Dehydrogenase 1 (*mFuDH\_Gal*, A0U94\_RS10160-70) wurden durch eine präparative PCR mit spezifischen den Primern GAL02ex\_for / \_rev (*sdh\_Gal*), GAL04ex\_for / \_rev (*sekADH\_Gal*) und GAL05ex\_for / GAL05ex\_neu\_rev (*mFuDH\_Gal*) (Tabelle 6-2) und der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase vervielfältigt (Kapitel 2.2.5.1). Die Ligation der Fragmente in einer SLiCE-Reaktion (Kapitel 2.2.8) wurde durch etwa 20 bp lange Überhänge an den Gen-spezifischen Primern komplementär zum 3'- bzw. 5'-Ende des Plasmid-Fragments ermöglicht. Nach einer Transformation in *E. coli* (Kapitel 2.3.3 und 2.3.4) wurden die Plasmide durch triparentale Konjugation auf den Multideletionsstamm BP.9 übertragen (Kapitel 2.3.5). Die erzeugten Expressionsstämme BP.9 pADH-mSDH\_Gal, BP.9 pADH-sekADH\_Gal und BP.9 pADH-mFuDH\_Gal sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst. Die Konstruktion und Charakterisierung der Stämme BP.9 pADH-sldAB\_Gal und BP.9 pADH-mGDH\_Gal, die die membranständige Polyol Dehydrogenase und Glucose Dehydrogenase aus *G. albidus* TMW2.1191 wurden bereits in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben. Die erhaltenen Stämme sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

**Tabelle 3-4.** Erstellte BP.9-Expressionsstämme, die eine membranständige Dehydrogenase aus *G. albidus* TMW2.1191 exprimieren

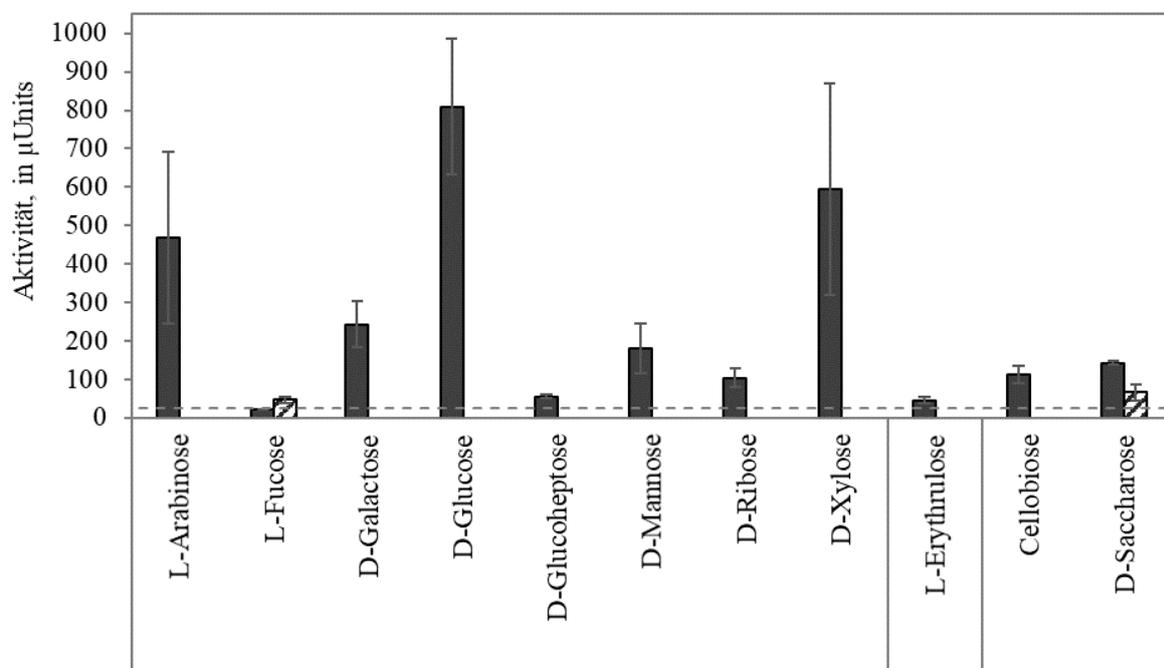
Organismus / Stamm	Eigenschaften
BP.9 pADH-sekADH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der sekundären Alkohol Dehydrogenase (A0U94_RS09810) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191
BP.9 pADH-mFuDH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der uncharakterisierten membranständigen Dehydrogenase 1 (A0U94_RS10160-70) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191
BP.9 pADH-mSDH_Gal	Derivat von pMM3b; Expression der Sorbitol Dehydrogenase (A0U94_RS04580-90) aus <i>G. albidus</i> TMW2.1191

### Substratspektren von membranständigen Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191

Um die Umsetzung verschiedener Substrate und mögliche Überlappungen in den Substratspektren der membranständigen Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 zu ermitteln, wurde wie zuvor die Oxidation mit 43 Substraten aus verschiedenen Substratklassen getestet. Alle verwendeten Substrate sind in Tabelle 6-4 aufgelistet. Die Abbildungen Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8 zeigen die Oxidationsaktivitäten der Dehydrogenasen für Substrate, bei denen mindestens eine Dehydrogenase eine Aktivität von 25  $\mu$ Units erreichte. Die unbekanntenen Dehydrogenasen wurden nach gemeinsamen Substraten mit den bereits charakterisierten membranständigen Polyol und Glucose Dehydrogenasen geordnet. So konnte gezeigt werden, dass die Gene A0U94\_RS04580-90 eine Sorbitol Dehydrogenase (SDH\_Gal) kodieren, die Glycerol, D-Arabitol, *meso*-Erythritol, D-Mannitol, D-Sorbitol und D-Xylitol oxidierte, wobei sie gegenüber D-Mannitol eine Oxidationsaktivität von etwa 1400  $\mu$ Units aufwies (Abbildung 3-7). Das Gen A0U94\_RS09810 kodiert dagegen eine sekundäre Alkohol Dehydrogenase (sekADH\_Gal), für die eine Oxidation von 2,3-Butandiol, 2,4-Pentandiol, 2-Hexanol, 2,5-Hexandiol, 1,3-Cyclopentandiol, 1,2-Cyclohexandiol und L-Erythrose nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-7). Dagegen zeigte BP.9 pADH-mFuDH\_Gal eine geringe Aktivität gegenüber L-Fucose und D-Saccharose, wodurch sie als membranständige Fucose Dehydrogenase (mFuDH) eingestuft wurde. Die Oxidation beider Substrate in Kombination zeigte sich in den vorherigen Messungen charakteristisch für membranständige Glucose Dehydrogenasen (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6), jedoch ist die mFuDH\_Gal im Gegensatz zur membranständigen Glucose Dehydrogenase aus drei Untereinheiten aufgebaut und nutzt als Kofaktor FAD. Somit konnte keine eindeutige Zuordnung der mFuDH\_Gal zu den bereits charakterisierten membranständigen Dehydrogenasen erfolgen.



**Abbildung 3-7.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) membranständiger Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 in Ganzzell-DCPIP-Assays mit überlappenden Substratspektren zu Polyol Dehydrogenasen. ■ BP.9 pADH-mSDH\_Gal, ▨ BP.9 pADH-sekADH\_Gal, ■ BP.9 pADH-sldAB\_Gal. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate



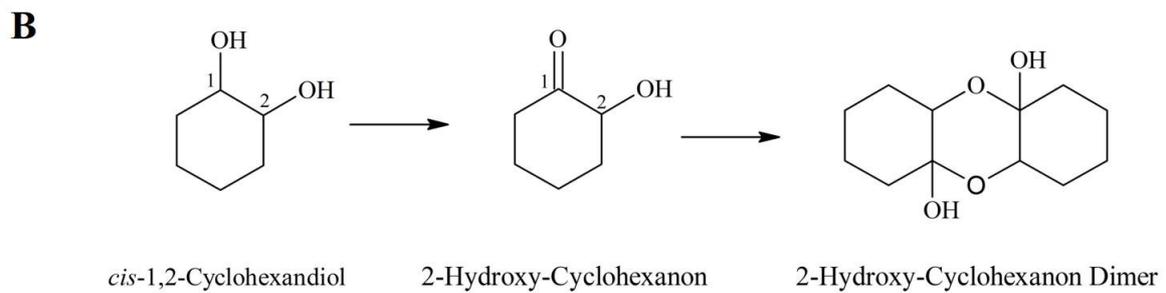
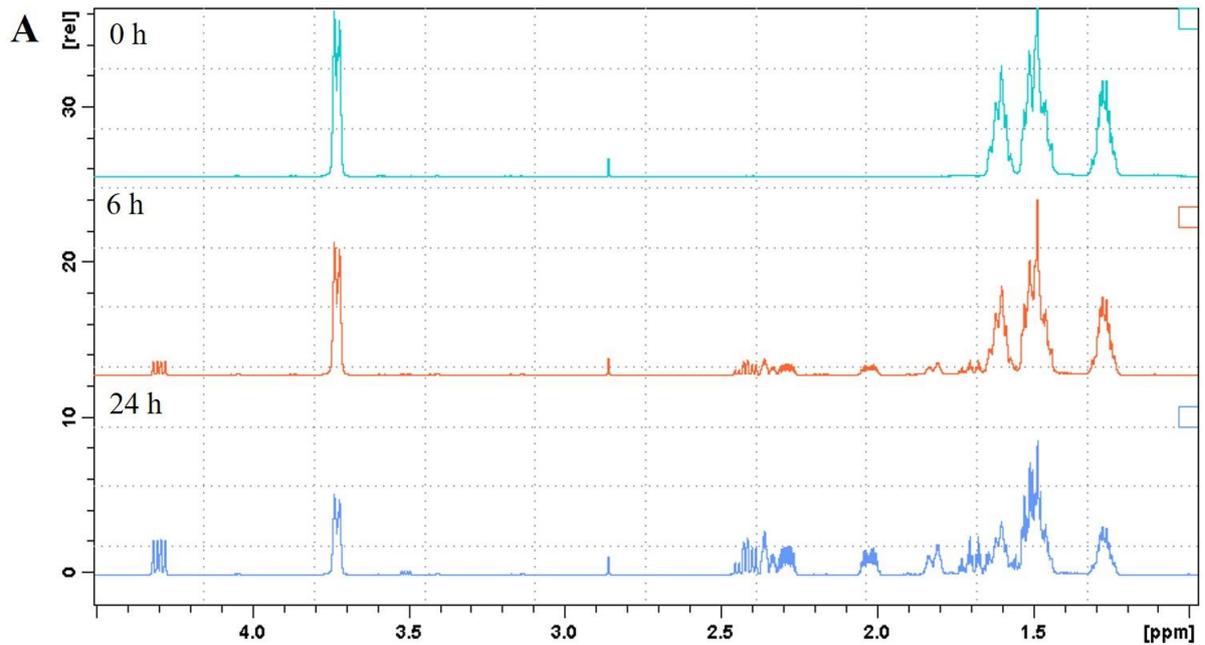
**Abbildung 3-8.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) membranständiger Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 in Ganzzell-DCPIP-Assays mit überlappenden Substratspektren zu membranständigen Glucose Dehydrogenasen. ■ BP.9 pADH-mGDH\_Gal, ▨ BP.9 pADH-mFuDH\_Gal. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-4 Replikate

### 3.2.4 Analyse der Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen durch NMR-Spektroskopie

Die Oxidationsprodukte der durch membranständige Dehydrogenasen katalysierten Reaktionen sind oft nicht bekannt, da durch etablierte analytische Methoden wie den Ganzzell-DCPIP-Assay nur die Umsetzung der Substrate gemessen wird, jedoch nicht die entstandenen Produkte. Aufgrund der zahlreichen Substrate der verschiedenen membranständigen Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien ist zur Aufklärung der Oxidationsprodukte eine Methode nötig, die ein möglichst wenig arbeits- und zeitintensives Screening der Produkte ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Vorgehen entwickelt werden, das eine Charakterisierung der Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen durch NMR-Spektroskopie mit hohem Durchsatz erlaubte. Als Substrat wurde *cis*-1,2-Cyclohexandiol ausgewählt, das durch Polyol Dehydrogenasen oxidiert wird (Kapitel 3.2.1) und dessen Oxidationsprodukt bisher nicht beschrieben wurde.

Das *cis*-1,2-Cyclohexandiol wurde dazu, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, in Biotransformationen mit ruhenden Zellen von BP.9 pMM4a-mSldAB über 24 h inkubiert. Zu Beginn der Biotransformation (0 h), sowie nach 6 h und 24 h Inkubationszeit wurde jeweils eine Probe entnommen. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die entnommenen Proben zur Abtrennung der Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur analytischen Auswertung bei – 20 °C gelagert. Die Messung der gebildeten Oxidationsprodukte erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik (TUM) (Kapitel 2.4.4) und wurde ohne weitere Reinigungsschritte direkt mit den Überständen der Biotransformation durchgeführt. Im Verlauf der Reaktion zeigte sich in den Proben nach 6 h bzw. 24 h Inkubation eine klare Änderung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von *cis*-1,2-Cyclohexandiol (Abbildung 3-9, A). Nur eine der beiden Hydroxyl-Gruppen wurde dabei durch die Katalyse der Oxidation von *cis*-1,2-Cyclohexandiol durch BP.9 pMM4a-mSldAB oxidiert. Als Produkt bildete sich 2-Hydroxy-Cyclohexanon, das sich anschließend zu einem 2-Hydroxy-Cyclohexanon Dimer zusammen lagerte (Abbildung 3-9, B).

Die eindeutige Strukturaufklärung der Oxidationsprodukte von *cis*-1,2-Cyclohexandiol direkt in Überständen von Biotransformationen mit ruhenden Zellen verdeutlichte die Einsetzbarkeit der NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung verschiedenster Oxidationsprodukte von membranständigen Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien.



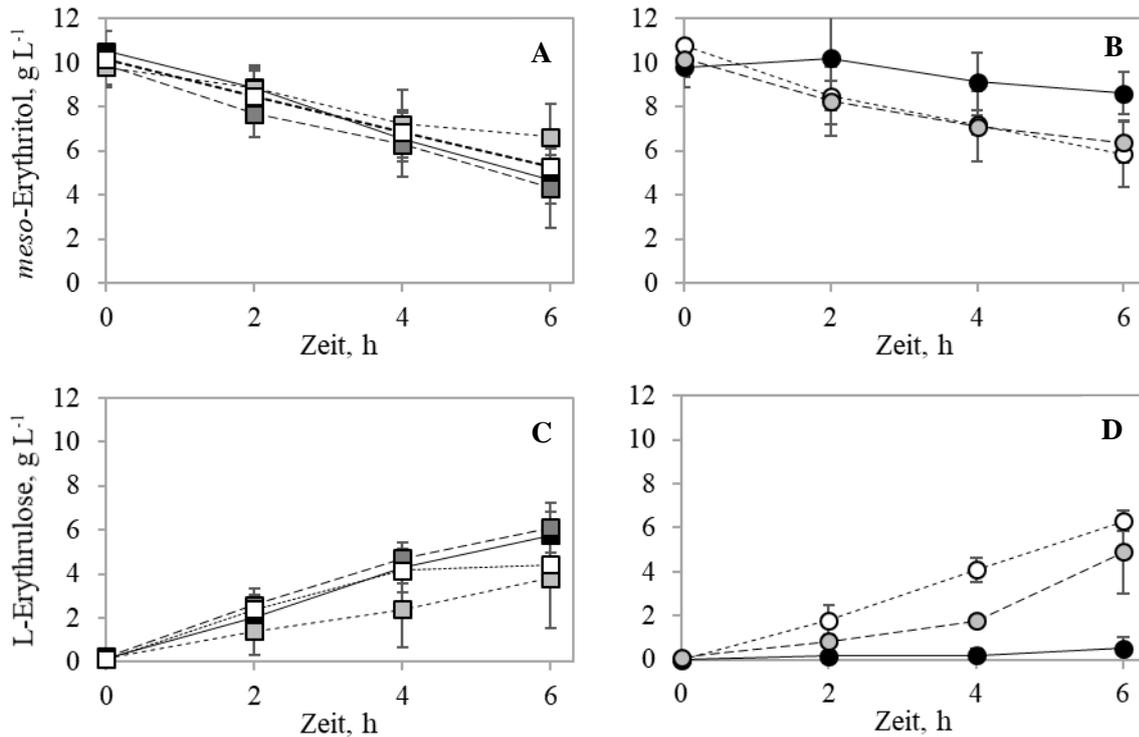
**Abbildung 3-9**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von *cis*-1,2-Cyclohexandiol. A)  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von 1,2-Cyclohexandiol und dessen Oxidationsprodukten aus Biotransformationen mit *SldAB\_621H* nach 0 h, 6 h und 24 h Inkubationszeit. B) Reaktionsmechanismus der Oxidation von *cis*-1,2-Cyclohexandiol. Biotransformation in 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 5, 50 mM Substrat und  $\text{OD}_{600} = 0,4$ .  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie mit 500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K. (Frank, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, TUM)

### 3.3 Stammentwicklung zur Produktion von L-Erythrose

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Polyol Dehydrogenasen, verschiedene Promotoren für deren Expression und unterschiedliche Expressionssysteme getestet, um einen hoch effizienten Produktionsstamm zur Gewinnung von L-Erythrose zu erhalten. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse wurden bereits in einem Manuskript mit dem Titel „Development of highly efficient L-erythrose producing whole cell catalysts using metabolic engineering“ zur Veröffentlichung zusammengefasst (Bode et al., in Vorbereitung). Ausgangspunkt für eine Überexpression der *sldAB*-Gene war dabei der Multideletionsstamm BP.9, in dem bereits neun membranständige Dehydrogenasen deletiert wurden.

#### 3.3.1 Oxidation von *meso*-Erythritol durch Polyol Dehydrogenasen

Die Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose wurde mit insgesamt sechs verschiedenen Polyol Dehydrogenasen charakterisiert, die im Multideletionsstamm BP.9 exprimiert wurden. Eine Auflistung der Stämme findet sich in Tabelle 2-5. Zum Vergleich der Auswirkung einer Überexpression der Polyol Dehydrogenasen in BP.9 zur nativen Expression auf die *meso*-Erythritol-Oxidation diente der Referenzstamm *G. oxydans* 621H mit dem Kontrollplasmid pMM2b (*G. oxydans* 621H pMM2b). Die Konstruktion der Stämme, sowie die Substratspektren und Oxidationsaktivitäten der exprimierten Polyol Dehydrogenasen wurden bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Umsetzung von 10 g L<sup>-1</sup> *meso*-Erythritol wurde in Biotransformationen mit ruhenden Zellen der Expressionsstämme in Schüttelkolben untersucht (Kapitel 2.3.8). Die Oxidationsprodukte wurden mittels HPLC analysiert (Kapitel 2.4.3). Im Vergleich zeigte sich, dass die Stämme BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pADH-sldAB\_Gal *meso*-Erythritol am effizientesten zu L-Erythrose oxidierten (Abbildung 3-10, A und C). Die Stämme BP.9 pADH-sldAB1\_3504, BP.9 pADH-sldAB2\_3504, BP.9 pADH-sldAB\_hans und BP.9 pADH-sldAB\_med (Abbildung 3-10, A bis D) erreichten dagegen nur Umsatzraten, die unter denen des Wildtypstammes *G. oxydans* 621H pMM2 lagen (Abbildung 3-10, B und D). Ergebnisse aus vorangegangenen Ganzzell-DCPIP-Assays decken sich mit diesen Beobachtungen (Abbildung 3-3). Da die Reaktionsgeschwindigkeit bei einigen Stämmen nach 6 h Inkubationszeit bereits abnahm, wurde die Effizienz der Ganzzellkatalysatoren nach 4 h anhand der Konversionsrate von *meso*-Erythritol, welche die Menge der gebildeten L-Erythrose bezogen auf die anfangs eingesetzte Menge an *meso*-Erythritol beschreibt, und der Produktausbeute an L-Erythrose verglichen (Tabelle 3-5). Es zeigte sich zwar, dass durch den Einsatz der Expressionsstämme BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pADH-sldAB\_Gal gegenüber dem Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 die Oxidationsrate von *meso*-Erythritol zu Erythrose und somit die Ausbeute an L-Erythrose im Mittel erhöht wurde, jedoch war dies aufgrund von Schwankungen in den einzelnen Messungen statistisch nicht signifikant. Auch in vorherigen Ganzzell-DCPIP-Assays in Kapitel 3.2.1 konnten für BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pADH-



**Abbildung 3-10.** Verlauf der Oxidation von *meso*-Erythritol zu *L*-Erythrulose in Biotransformationen über 6 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen, die verschiedene Polyol Dehydrogenasen exprimieren. A und B: Umsetzung von *meso*-Erythritol, C und D: Bildung von *L*-Erythrulose; —■— BP.9 *pMM4a-mSldAB*, —■— BP.9 *pADH-sldAB\_Gal*, -□- BP.9 *pADH-sldAB1\_3504*, --□-- BP.9 *pADH-sldAB2\_3504*, —●— BP.9 *pADH-sldAB\_hans*, —●— BP.9 *pADH-sldAB\_med*, --○-- *G. oxydans* 621H *pMM2*.  $C_{\text{meso-Erythritol}} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 5, 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . (Bode et al., in Vorbereitung)

*sldAB\_Gal* die höchsten Aktivitäten gegenüber *meso*-Erythritol mit 93  $\mu\text{Units}$  bzw. 101  $\mu\text{Units}$  ermittelt werden (Abbildung 3-3). Vergleicht man diese Werte mit der oxidativen Aktivität von *G. oxydans* 621H von 84,3  $\mu\text{Units}$  (Tabelle 3-1), konnte in Ganzzell-DCPIP-Assays im Mittel ebenfalls eine leichte Erhöhung der oxidativen Aktivität gegenüber *meso*-Erythritol durch Überexpression der *sldAB*-Gene gezeigt werden. Jedoch konnte auch in diesem Fall durch Schwankungen in den einzelnen Messungen für diese Änderung keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

**Tabelle 3-5.** Konversionsrate von *meso*-Erythritol und Produktausbeute an L-Erythrose in Biotransformationen nach 4 h Inkubationszeit durch Expression verschiedener Polyol Dehydrogenasen vom Expressionsplasmid pMM3b im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 im Vergleich zu Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2. Versuche wurden mit 10 g L<sup>-1</sup> *meso*-Erythritol in 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5) und mindestens in Triplikaten durchgeführt.

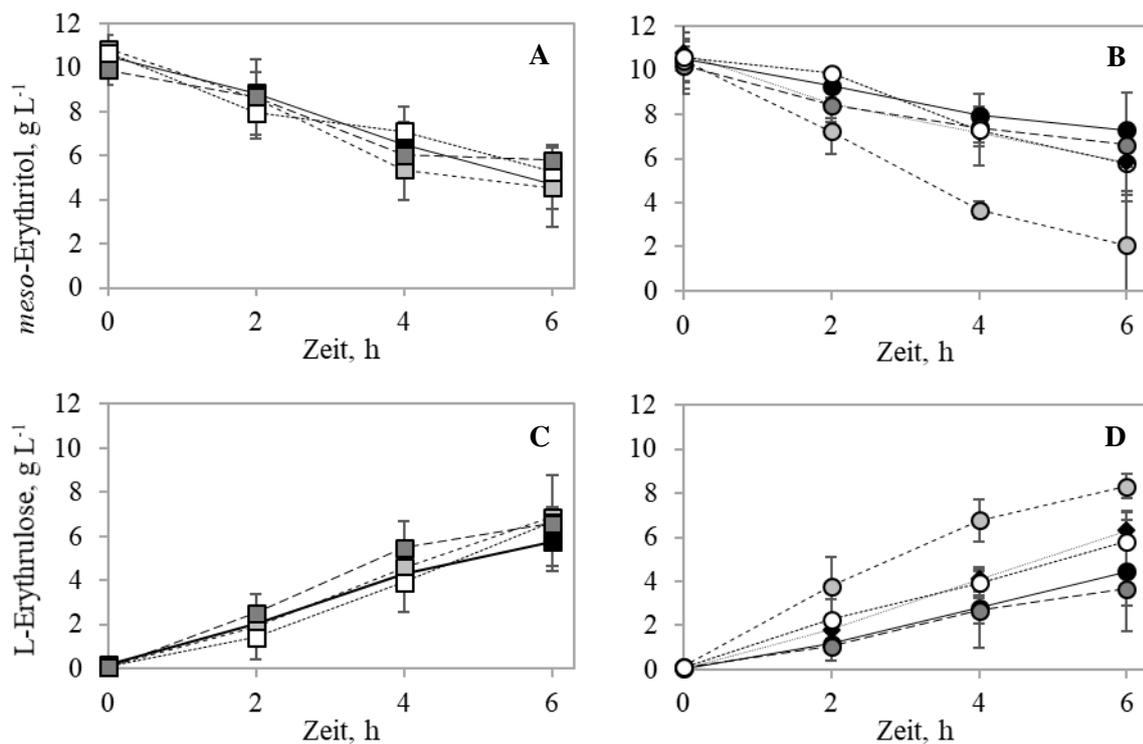
	Konversionsrate (%)	Produktausbeute (g L <sup>-1</sup> )
<i>G. oxydans</i> 621H pMM2	38,0	4,1 ± 0,5
BP.9 pMM4a-mSldAB	41,0	4,3 ± 0,8
BP.9 pADH-sldAB_Gal	47,6	4,7 ± 0,7
BP.9 pADH-sldAB1_3504	24,3	2,4 ± 1,7
BP.9 pADH-sldAB2_3504	41,0	4,2 ± 1,0
BP.9 pADH-sldAB_hans	2,2	0,2 ± 0,3
BP.9 pADH-sldAB_med	17,5	1,8 ± 0,2

### 3.3.2 Promotoren aus *G. oxydans* zur Expression von Polyol Dehydrogenasen

Zusätzlich zur Expression verschiedener Polyol Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien wurde auch der Einfluss der Expressionsstärke auf deren Oxidationsaktivität durch den Einsatz verschiedener Promotoren aus *G. oxydans* 621H geprüft. In diesem Projekt wurden sechs Promotoren membranständiger Dehydrogenasen (Prom<sub>mADH</sub>, Prom<sub>G2DH</sub>, Prom<sub>LG2DH</sub>, Prom<sub>mIDH</sub>, Prom<sub>mSDH</sub>, Prom<sub>sldAB</sub>), ein ribosomaler Promotor (Prom<sub>452</sub>) und der Promotor des Elongationsfaktors Tu (Prom<sub>TuFB</sub>) ausgewählt und getestet, die bereits in vorherigen Veröffentlichungen zur Überexpression membranständiger Dehydrogenasen beschrieben wurden (Kostner 2013; Mientus et al. 2017; Merfort 2006; Kallnik et al. 2010; Gätgens et al. 2007). Als Enzym wurde die native Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H ausgewählt, die in den vorherigen Experimenten bereits gute Ergebnisse lieferte (Kapitel 3.3.1). Eine Beschreibung der verwendeten Stämme findet sich in Tabelle 2-6. Als Referenzstamm diente wie schon zuvor *G. oxydans* 621H pMM2. Die Expressionsstämme BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pMM4b-mSldAB, die den Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (GOX\_RS06485-90, 225 bp) und den Promotor der Inositol Dehydrogenase (GOX\_RS10540, 219 bp) tragen, wurden schon in einer vorherigen Studie charakterisiert (Mientus et al. 2017). Auch das Plasmid pJV17 mit dem Promotor des Elongationsfaktors Tu (GOX\_RS03065, 457 bp) wurde schon zuvor beschrieben (Voss 2009) und lag in der lehrstuhl internen Stammsammlung bereits als BP.9 pJV17 vor (Mientus, unveröffentlichte Daten). Die verbliebenen Stämme BP.9 pG2DH-sldAB\_621H und BP.9 pLG2DH-sldAB\_621H mit dem Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX\_RS07330-40, 191 bp) bzw. dessen verlängerte Version (326 bp), BP.9 pSDH-sldAB\_621H, der den Promotor der Sorbitol Dehydrogenase trägt (GOX\_RS11745-55, 279 bp), BP.9 pSldAB-sldAB\_621H mit dem nativen Promotor der Polyol Dehydrogenase (GOX\_RS05400-5, 114 bp) und

BP.9 p452-sldAB\_621H mit dem Promotor des ribosomalen Proteins L13 (GOX\_RS03405, 189 bp) waren ebenfalls bereits am Lehrstuhl vorhanden (Mientus, unveröffentlichte Daten; Peter 2016).

Der Einfluss der Promotoren auf die Expression der *sldAB*-Gene und die daraus resultierende oxidative Aktivität der Ganzzellkatalysatoren gegenüber *meso*-Erythritol wurde in Biotransformationen gemessen. Die Experimente wurden gemäß Kapitel 2.3.8 mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  *meso*-Erythritol in Schüttelkolben durchgeführt. Dabei wurde mit dem Stamm BP.9 pJV17 die schnellsten Umsätze von *meso*-Erythritol und auch die höchste Ausbeute von  $8,3 \text{ g L}^{-1}$  L-Erythulose nach 6 h erzielt (Abbildung 3-11 B und D). Der Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 erreichte nach 6 h eine Ausbeute von  $6,3 \text{ g L}^{-1}$  L-Erythulose (Abbildung 3-11 D). Die Oxidationsaktivität und daher auch die Konzentration an L-Erythulose war mit BP.9 pJV17 gegenüber dem *G. oxydans* 621H pMM2 bei allen Messpunkten signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test). Die verbliebenen Expressionsstämme erreichten im Vergleich zum Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 keine statistisch signifikante Steigerung der Umsätze. Die Ausbeuten an L-Erythulose waren mit BP.9 pSldAB-sldAB\_621H nach 4 h und 6 h



**Abbildung 3-11.** Verlauf der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythulose in Biotransformationen über 6 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen. Expression der *SldAB\_621H* unter Kontrolle verschiedener Promotoren auf einem Expressionsplasmid und nativ in *G. oxydans* 621H pMM2. A und B: Umsetzung von *meso*-Erythritol, C und D: Bildung von L-Erythulose; —■— BP.9 pMM4a-mSldAB, —■— BP.9 pMM4b-mSldAB, -□- BP.9 pG2DH-sldAB\_621H, -□- BP.9 pLG2DH-sldAB\_621H, —●— BP.9 pSDH-sldAB\_621H, —●— BP.9 pSldAB-sldAB\_621H, -○- BP.9 pJV17, -○- BP.9 p452-sldAB\_621H, .....◆..... *G. oxydans* 621H pMM2.  $c_{\text{meso-Erythritol}} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 5,  $67 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ . (Bode et al., in Vorbereitung)

Inkubation im Vergleich zu *G. oxydans* 621H pMM2 sogar um 30 – 40 % gesunken ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Abbildung 3-11). Die Konversionsrate von *meso*-Erythritol und Produktausbeute an L-Erythrose wurde, wie schon zuvor, nach 4 h Inkubation bestimmt, um die Effizienz der einzelnen Stämme miteinander zu vergleichen (Tabelle 3-6). Auch hier zeigte sich, dass bei einem Vergleich des Referenzstammes *G. oxydans* 621H pMM2 für fast alle getesteten Stämme keine Veränderung der L-Erythrose Ausbeute und damit der oxidativen Eigenschaften gegenüber *meso*-Erythritol erreicht wurde. Nur die Biotransformation mit BP.9 pJV17 führte zu einer signifikanten Steigerung der Konversionsrate und der Produktausbeute um das 1,6-Fache von  $4,1 \text{ g L}^{-1}$  auf  $6,8 \text{ g L}^{-1}$  verglichen mit *G. oxydans* 621H pMM2 ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Tabelle 3-6). Auch die Konversionsrate stieg mit BP.9 pJV17 im Vergleich zu *G. oxydans* 621H pMM2 um das 1,9-Fache (Tabelle 3-6).

**Tabelle 3-6.** Konversionsrate von *meso*-Erythritol und Produktausbeute an L-Erythrose in Biotransformationen nach 4 h Inkubationszeit durch Expression der *sldAB\_621H*-Gene von Expressionsplasmid mit verschiedenen Promotoren in Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 im Vergleich zu Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2. Versuche wurden mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose in  $67 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  mindestens in Triplikaten durchgeführt.

	Konversionsrate (%)	Produktausbeute ( $\text{g L}^{-1}$ )
<i>G. oxydans</i> 621H pMM2	38,0	$4,1 \pm 0,5$
BP.9 pMM4a-mSldAB	41,0	$4,3 \pm 0,8$
BP.9 pMM4b-mSldAB	55,5	$5,5 \pm 1,0$
BP.9 pG2DH-sldAB_621H	42,2	$4,6 \pm 0,7$
BP.9 pLG2DH-sldAB_621H	36,6	$3,9 \pm 1,7$
BP.9 pSDH-sldAB_621H	26,5	$2,8 \pm 0,3$
BP.9 pSldAB-sldAB_621H	26,0	$2,7 \pm 0,2$
BP.9 pJV17	64,7	$6,8 \pm 1,0$
BP.9 p452-sldAB_621H	36,9	$3,9 \pm 0,6$

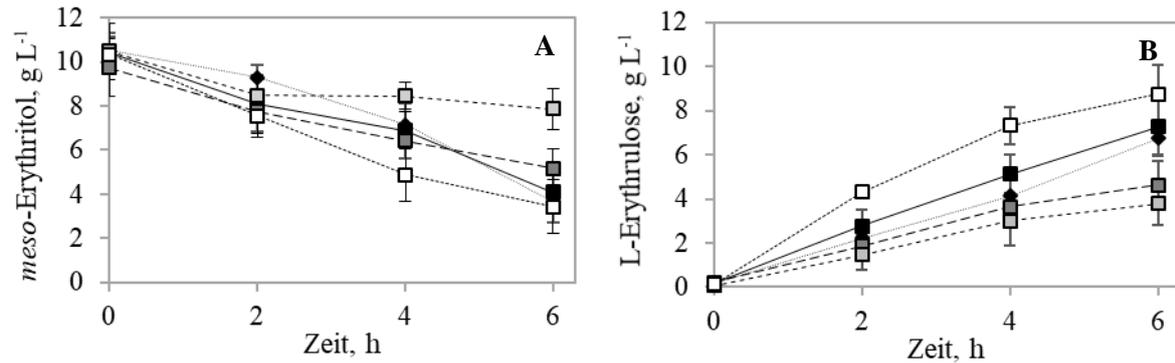
### 3.3.3 Chromosomale Expression von Polyol Dehydrogenasen zur Herstellung von L-Erythrose

Eine stabile Expression von Enzymen ist in industriellen Herstellungsprozessen von hoher Bedeutung. Der kostenintensive Einsatz von Antibiotika, der bei Plasmid-basierter Expression der Enzyme zur Erhaltung der Plasmide benötigt werden, kann durch eine stabile Expression der Gene vom bakteriellen Chromosom vermieden werden. Auch die Downstream-Prozesse zur Isolation des reinen Produkts werden dadurch vereinfacht, da Antibiotika-Reste nicht aufwendig abgetrennt werden müssen. Daher wurde die Expression der *sldAB*-Gene aus *G. oxydans* 621H von verschiedenen Loci und mit unterschiedlichen Promotoren für eine Ganzzellkatalyse der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose getestet. Die verwendeten Stämme BP.8, in dem die Gene der Polyol Dehydrogenase nativ

in der Zelle vorhanden waren, und BP.9  $\Delta madh::sldAB$ , in dem die *sldAB*-Gene im Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase exprimiert wurden, wurden bereits in einer früheren Arbeit beschrieben (Peters 2013). Zusätzlich wurden Integrationsmutanten konstruiert, in denen die *sldAB\_621H*-Gene im Locus der Gluconat-2-Dehydrogenase im Multideletionsstamm BP.9 und der Promotor des Elongationsfaktors Tu (*tufB*) *upstream* der *sldAB*-Gene im Multideletionsstamm BP.8 integriert wurden. Die Insertion der Gene bzw. des Promotors erfolgte mithilfe des markerfreien *codBA*-Systems (Kapitel 2.3.6). Die *sldAB*-Gene (GOX\_RS05400 und GOX\_RS05405) wurden zum einen in den ursprünglichen ORF (*open reading frame*) der *g2dh*-Gene (GOX\_RS07330-40) inseriert, wodurch die Transkription durch den Promoter der Gluconat-2-Dehydrogenase kontrolliert wurde. Zum anderen wurde ein DNA-Fragment mit 483 bp *upstream* des Startcodons des *tufB*-ORFs (GOX\_RS03065), das den *tufB*-Promoter beinhaltet, zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und dem Promoter der *sldAB*-Gene inseriert. Für die benötigten Plasmid-Fragmente wurde das Plasmid pKOS6b mit den Primern pKOS\_InsSldAB621H\_G2DH\_for/ \_rev bzw. pKos\_InsP11sldAB\_for/ \_rev in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1). Für die Konstruktion des Integrationsplasmids pKOS6b-InsSldAB621H\_LocG2DH wurden die Flanken mit den Primern FlankeUpLocG2DH\_for/ \_rev bzw. FlankeDownLocG2DH\_for/ \_rev und die Gene GOX\_RS05400-05 mit den Primern sldAB621H\_LocG2DH\_for/ \_rev vervielfältigt. Das Integrationsplasmid pKOS6b-InsP11sldAB\_621H wurde durch die Amplifikation der Flanken mit den Primern sldAB621H\_up\_for/ sldAB621H\_p11up\_rev bzw. sldAB621H\_p11down\_for/ sldAB621H\_down\_rev und der *tufB*-Promotor mit den Primern PromTufBgenom\_for/ \_rev hergestellt. Die hierzu verwendeten Oligonukleotide wurden in Tabelle 6-3 zusammengefasst. Die einzelnen Fragmente der Plasmide wurden mit der SLiCE-Klonierungsmethode ligiert (Kapitel 2.2.8) und in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.3.3). Nach der triparentalen Konjugation in BP.9 (pKOS6b-InsSldAB621H\_LocG2DH) und BP.8 (pKOS6b-InsP11sldAB\_621H) (Kapitel 2.3.5) wurden die Integrationsmutanten BP.9  $\Delta g2dh::sldAB$  und BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode selektiert. Die verwendeten Insertionsplasmide finden sich in Tabelle 2-4. Die erhaltenen Stämme sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

**Tabelle 3-7.** Konstruierte Insertionsmutanten für die Expression von Polyol-Dehydrogenasen in Multideletionsstämmen von *G. oxydans* 621H

Stamm	Eigenschaften
BP.9 $\Delta g2dh::sldAB$	BP.9 mit Insertion der <i>sldAB</i> Gene aus <i>G. oxydans</i> 621H in den Locus der Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX_RS07330-40)
BP.8 <i>sldAB::tufB<sub>Prom</sub></i>	BP.9 mit Insertion der <i>tufB</i> -Promotorsequenz <i>upstream</i> der <i>sldAB</i> Gene (GOX_RS5400-05)



**Abbildung 3-12.** Verlauf der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose in Biotransformationen über 6 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen. Expression der *sldAB\_621H*-Gene erfolgte chromosomal von verschiedenen Loci in BP.9. A: Umsetzung von *meso*-Erythritol, B: Bildung von L-Erythrulose; —■— BP.8, -■- BP.9  $\Delta madh::sldAB$ , -□- BP.9  $\Delta g2dh::sldAB$ , --□-- BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>*, .....◆..... *G. oxydans 621H*.  $c_{meso-Erythritol} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 5, 67 mM  $KH_2PO_4$ . (Bode et al., in Vorbereitung)

Zur Untersuchung der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrulose mit Integrationsmutanten wurden Biotransformationen in Schüttelkolben mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  *meso*-Erythritol genutzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-12 dargestellt. Eine vergleichsweise langsame Umsetzung des *meso*-Erythritols und Produktion der L-Erythrulose waren mit BP.9  $\Delta g2dh::sldAB$  zu beobachten. Nach 4 h Inkubation wurde mit diesem Stamm eine Konversionsrate von nur 28,5 % gemessen, was nur etwa 73 % der Konversionsrate von *G. oxydans 621H* entsprach (Tabelle 3-8). Während BP.9  $\Delta madh::sldAB$  in den ersten Stunden der Biotransformation noch einen ähnlichen Verlauf zeigte wie der Wildtypstamm *G. oxydans 621H*, stieg die Konzentration an L-Erythrulose mit den Stämmen BP.8 und BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* während dieser Zeit über die von *G. oxydans 621H* erreichte Konzentration (Abbildung 3-12). Dabei waren, ähnlich zu den Experimenten mit verschiedenen Promotoren zur Expression von Polyol Dehydrogenasen (Kapitel 3.3.2), beim Stamm BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* die höchsten Ausbeuten an L-Erythrulose zu beobachten (Abbildung 3-12). Die Oxidationsaktivität von BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* gegenüber *G. oxydans 621H* war bei allen Messwerten signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Abbildung 3-12 B). Auch die Konversionsrate und Produktausbeute von BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* nach 4 h Inkubationszeit stieg im Vergleich zu *G. oxydans 621H* um das 1,8-Fache und betragen 70,9 % bzw.  $7,3 \text{ g L}^{-1}$  L-Erythrulose (Tabelle 3-8). Durch Insertion des TufB-Promotors zwischen den *sldAB*-Genen und deren nativen Promotor in BP.8, wurde außerdem im Vergleich zu BP.8 die Produktausbeute an L-Erythrulose bei Biotransformationen in Schüttelkolben mit dem Stamm BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* um etwa 40 % gesteigert.

**Tabelle 3-8.** Konversionsrate von *meso*-Erythritol und Produktausbeute an L-Erythrulose in Biotransformationen nach 4 h Inkubationszeit durch Expression der Polyol Dehydrogenase SldAB\_621H von verschiedenen Loci im Chromosom von Multideletionsstämmen im Vergleich zu Wildtypstamm *G. oxydans* 621H. Versuche wurden mit 10 g L<sup>-1</sup> *meso*-Erythritol in 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und mindestens in Triplikaten durchgeführt.

	Konversionsrate (%)	Produktausbeute (g L <sup>-1</sup> )
<i>G. oxydans</i> 621H	39,3	4,1 ± 0,9
BP.8	49,0	5,1 ± 0,9
BP.9 $\Delta$ <i>madh</i> :: <i>sldAB</i>	37,4	3,6 ± 0,6
BP.9 $\Delta$ <i>g2dh</i> :: <i>sldAB</i>	28,5	3,0 ± 1,1
BP.8 <i>sldAB</i> :: <i>tufB</i> <sub>Prom</sub>	70,9	7,3 ± 0,8

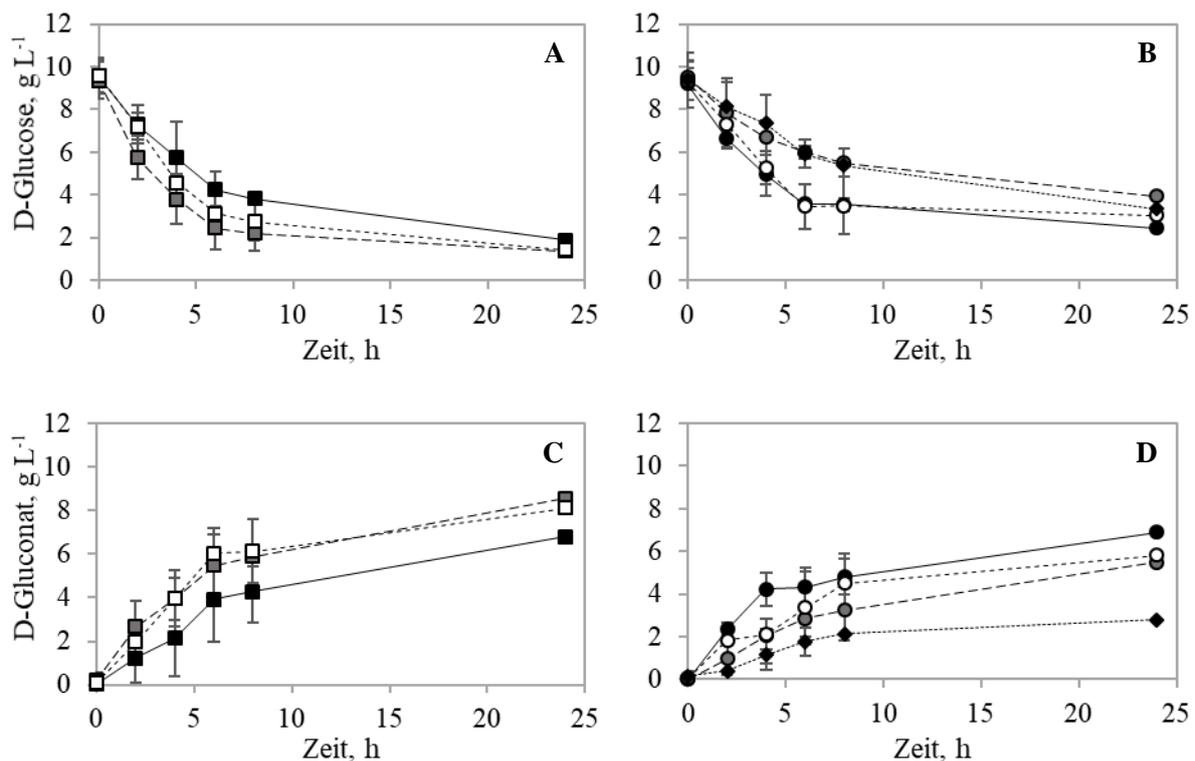
### 3.4 Stammentwicklung zur Produktion von 5-Keto-D-Gluconat

In der vorliegenden Arbeit sollte ein biotechnologischer Prozess zur Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose mit einem *Gluconobacter*-Produktionsstamm etabliert werden. Die Reaktion verläuft in *G. oxydans* 621H in zwei Schritten durch membranständige Dehydrogenasen (Abbildung 1-1). Die Oxidation von D-Glucose zu D-Glucono- $\delta$ -Lacton, wird durch die membranständige Glucose Dehydrogenase (mGDH) katalysiert, welches spontan zu D-Gluconat hydrolysiert (García-García et al. 2017). Die nachfolgende Oxidation des D-Gluconats zu 5-Keto-D-Gluconat erfolgt mit einer membranständigen Polyol Dehydrogenase (SldAB) (Matsushita et al. 2003). D-Gluconat kann in *G. oxydans* 621H jedoch auch durch die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase (G2DH) zu 2-Keto-D-Gluconat oxidiert werden (García-García et al. 2017). Um einen Produktionsstamm zur Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat ohne Bildung von Nebenprodukten zu erhalten, musste die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase im Produktionsstamm daher zwingend deletiert sein (Elfari et al. 2005). Aufgrund dessen wurde der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 als Ausgangsstamm gewählt, da in diesem Stamm bereits insgesamt neun membranständige Dehydrogenasen deletiert wurden. Dies verhinderte die Produktion von unerwünschten Nebenprodukten und ermöglichte eine präzise Auswahl der membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase, um einen effizienten Ganzzellkatalysator für die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat zu entwickeln.

#### 3.4.1 Charakterisierung der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat durch membranständige Glucose Dehydrogenasen

Zunächst wurde der erste Oxidationsschritt von D-Glucose zu D-Gluconat untersucht, der von der membranständigen Glucose Dehydrogenase katalysiert wird. Dazu wurden sechs Expressionsstämme basierend auf *G. oxydans* 621H BP.9 verwendet, die eine membranständige Glucose Dehydrogenase auf dem Plasmid pMM3b exprimierten. Die Konstruktion der Stämme wurde bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Bei einer ersten Charakterisierung der Enzyme durch Ganzzell-DCPIP-Assays in Kapitel 3.2.2 konnten bereits die oxidativen Aktivitäten gegenüber D-Glucose von teilweise über 900  $\mu$ Units für sechs der sieben untersuchten Enzyme nachgewiesen werden. Im Screening der Stammsammlung in Ganzzell-DCPIP-Assays (Kapitel 3.1) erreichte der Wildtypstamm *G. oxydans* 621H nur eine oxidative Aktivität von etwa 300  $\mu$ Units. Um die Umsetzung von D-Glucose zu D-Gluconat in Biotransformationen zu untersuchen, wurden ruhende Zellen der verschiedenen Stämme mit 10 g L<sup>-1</sup> D-Glucose in Schikanekolben inkubiert. Als Referenzstamm diente *G. oxydans* 621H pMM2, um einen Vergleich der Auswirkung einer Überexpression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen zu der nativen Expression auf die Glucose-Oxidation zu ermöglichen. Da membranständige Glucose Dehydrogenasen ein Optimum bei pH 5 bis 6 aufweisen (Ameyama et al. 1981a; Sará-Páez et al. 2015), wurde der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Proben wurden über 24 h aus den

Biotransformationen entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-13 dargestellt. Es zeigte sich, dass durch die Überexpression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9 die Oxidation der D-Glucose und auch die Ausbeute an D-Gluconat im Vergleich zum Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 erheblich gesteigert wurde (Abbildung 3-13). So oxidierten die Stämme BP.9 pMM4a-mGDH, BP.9 pADH-mGDH\_Gal, BP.9 pADH-mGDH1\_3504 und BP.9 pADH-mGDH\_PA15 innerhalb von 24 h über 80 % der eingesetzten D-Glucose. BP.9 pADH-mGDH\_hans, BP.9 pADH-mGDH\_med und *G. oxydans* 621H pMM2 setzten zwischen 60 % und 70 % der D-Glucose um (Abbildung 3-13, A und B). Die gebildeten Mengen an D-Gluconat wichen noch weiter voneinander ab. Während mit den Stämmen BP.9 pADH-mGDH\_Gal und BP.9 pADH-mGDH1\_3504 die höchsten Konzentrationen an D-Gluconat mit 8,6 g L<sup>-1</sup> bzw. 8,1 g L<sup>-1</sup> nach 24 h erreicht wurden, wurden mit BP.9 pMM4a-mGDH, BP.9 pADH-mGDH\_PA15, BP.9 pADH-mGDH\_hans und BP.9 pADH-mGDH\_med zwischen 5,5 g L<sup>-1</sup> und 6,9 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat gebildet



**Abbildung 3-13.** Verlauf der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat in Biotransformationen über 24 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen. Expression der mGDH-Gene erfolgte auf dem Expressionsplasmid pMM3b mit dem Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenase in BP.9 und nativ in *G. oxydans* 621H pMM2. A und B: Umsetzung der D-Glucose, C und D: Bildung von D-Gluconat; —■— BP.9 pMM4a-mGDH, —■— BP.9 pADH-mGDH\_Gal, -□- BP.9 pADH-mGDH1\_3504, —●— BP.9 pADH-mGDH\_PA15, —●— BP.9 pADH-mGDH\_hans, -○- BP.9 pADH-mGDH\_med, ---◆--- *G. oxydans* 621H pMM2.  $c_{D-Glucose} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 6, 67 mM  $KH_2PO_4$ . 3-7 Replikate

(Abbildung 3-13, C und D). Mit dem Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 wurde nur eine Ausbeute von  $2,8 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat erreicht (Abbildung 3-13, D). Für die drei Stämme mit den höchsten Ausbeuten (BP.9 pADH-mGDH\_Gal, BP.9 pADH-mGDH1\_3504 und BP.9 pADH-mGDH\_PAI5) konnte eine signifikante Steigerung der Glucose-Oxidation und der Gluconat-Produktion über den gesamten Zeitraum der Biotransformation nachgewiesen werden ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Abbildung 3-13, A und C). Die Produktion von D-Gluconat konnte folglich durch Expression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen in BP.9 bei einem Vergleich mit *G. oxydans* 621H pMM2 nach einer Inkubation von 24 h bis auf das 2,8-Fache (BP.9 pADH-mGDH\_Gal) gesteigert werden. Die Oxidationsrate verringerte sich jedoch bei allen Stämmen nach 6 h deutlich. Deshalb wurden zum Vergleich der Effektivität der Stämme jeweils die Konversionsrate an D-Glucose und die Produktausbeute bzw. die spezifische Produktausbeute  $Y_{P/S}$  an D-Gluconat für jeden Stamm nach 6 h Inkubation bestimmt (Tabelle 3-9). Die Konversionsrate beschreibt dabei die Menge des gebildeten Produkts bezogen auf die anfangs eingesetzte Menge an Substrat. Die spezifische Produktausbeute  $Y_{P/S}$  gibt dagegen die Menge an gebildeten Produkt pro verbrauchtem Substrat an. Die Konversionsraten von D-Glucose lagen hier zwischen 18,6 % und 63,0 %, wobei der niedrigste Wert für *G. oxydans* 621H pMM2 und der höchste Wert für BP.9 pADH-mGDH\_Gal ermittelt wurde. Im gleichen Zeitraum wurden Produktausbeuten an D-Gluconat zwischen  $1,8 \text{ g L}^{-1}$  und  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Die höchsten Ausbeuten mit  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  bzw.  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  wurden wiederum mit BP.9 pADH-mGDH1\_3504 und BP.9 pADH-mGDH\_Gal erzielt (Tabelle 3-9). BP.9 pADH-mGDH1\_3504 oxidierte gleichzeitig als einziger Stamm die gesamte während der Biotransformation verbrauchte D-Glucose zu D-Gluconat ( $Y_{P/S} = 1,03 \text{ g g}^{-1}$ ). Dadurch konnten die Ergebnisse der Ganzzell-DCPIP-Assays bestätigt werden (Kapitel 3.2.2).

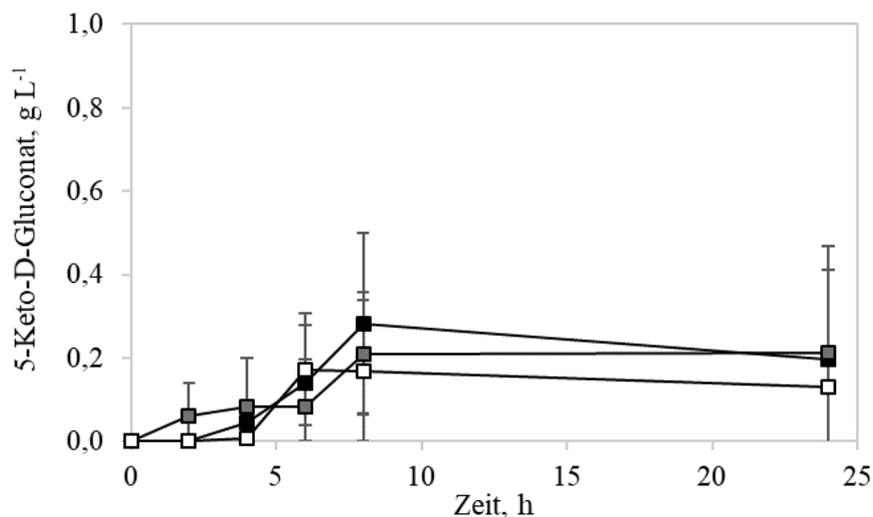
**Tabelle 3-9.** Konversionsrate von D-Glucose und Produktausbeute bzw. spezifische Produktausbeute  $Y_{P/S}$  an D-Gluconat nach 6 h durch Expression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen mit Expressionsplasmid in Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 im Vergleich zu Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2. Versuche wurden mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose in  $67 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 6 und mindestens in Triplikaten durchgeführt.

	Konversionsrate (%)	Produktausbeute ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )
<i>G. oxydans</i> 621H	18,6	$1,8 \pm 0,7$	0,61
BP.9 pMM4a-mGDH	34,9	$3,3 \pm 1,9$	0,73
BP.9 pADH-mGDH_Gal	58,8	$5,5 \pm 1,7$	0,89
BP.9 pADH-mGDH1_3504	63,0	$6,0 \pm 0,9$	1,03
BP.9 pADH-mGDH_PAI5	47,1	$4,3 \pm 0,9$	0,92
BP.9 pADH-mGDH_hans	36,1	$3,4 \pm 1,7$	0,83
BP.9 pADH-mGDH_med	30,0	$2,9 \pm 0,1$	0,79

### 3.4.2 Charakterisierung der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat durch Polyol Dehydrogenasen

Die zweite Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat sollte durch die Auswahl einer geeigneten Polyol-Dehydrogenase erfolgen. Hier war der Einsatz des Multideletionsstammes BP.9 als Ausgangsstamm essenziell, da dort die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase (GOX\_RS07330-40) bereits deletiert wurde. Diese ist für Bildung von 2-Keto-D-Gluconat durch Oxidation von D-Gluconat verantwortlich und katalysiert so eine unerwünschte Konkurrenzreaktion in der Oxidation von D-Gluconat (Shinagawa et al. 1984; Hölscher et al. 2009; Ano et al. 2011).

In der zuvor erfolgten Charakterisierung verschiedener Polyol Dehydrogenasen in BP.9 durch Ganzzell-DCPIP-Assays (Kapitel 3.2.1) konnte nur für die Polyol Dehydrogenase SldAB\_621H aus *G. oxydans* 621H eine Aktivität über dem Schwellenwert von 25  $\mu$ Units gezeigt werden. Für die Polyol Dehydrogenasen SldAB\_Gal aus *G. albidus* TMW2.1191 und SldAB2\_3504 aus *G. oxydans* DSM 3504 waren zwar ebenfalls oxidative Aktivitäten gegenüber D-Gluconat messbar, allerdings lagen diese unterhalb des festgelegten Schwellenwertes von 25  $\mu$ Units (Abbildung 3-4). Dennoch wurde die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Gluconat mit allen sechs in Kapitel 3.2.1 charakterisierten Expressionsstämmen in Biotransformationen getestet, die eine Polyol Dehydrogenase exprimierten, um die Polyol Dehydrogenase mit der höchsten Aktivität gegenüber D-Gluconat eindeutig zu identifizieren. Dazu wurden ruhende Zellen von BP.9 pMM4a-mSldAB, BP.9 pADH-sldAB\_Gal, BP.9 pADH-sldAB1\_3504, BP.9 pADH-sldAB2\_3504, BP.9 pADH-sldAB\_hans und BP.9 pADH\_sldAB\_med mit



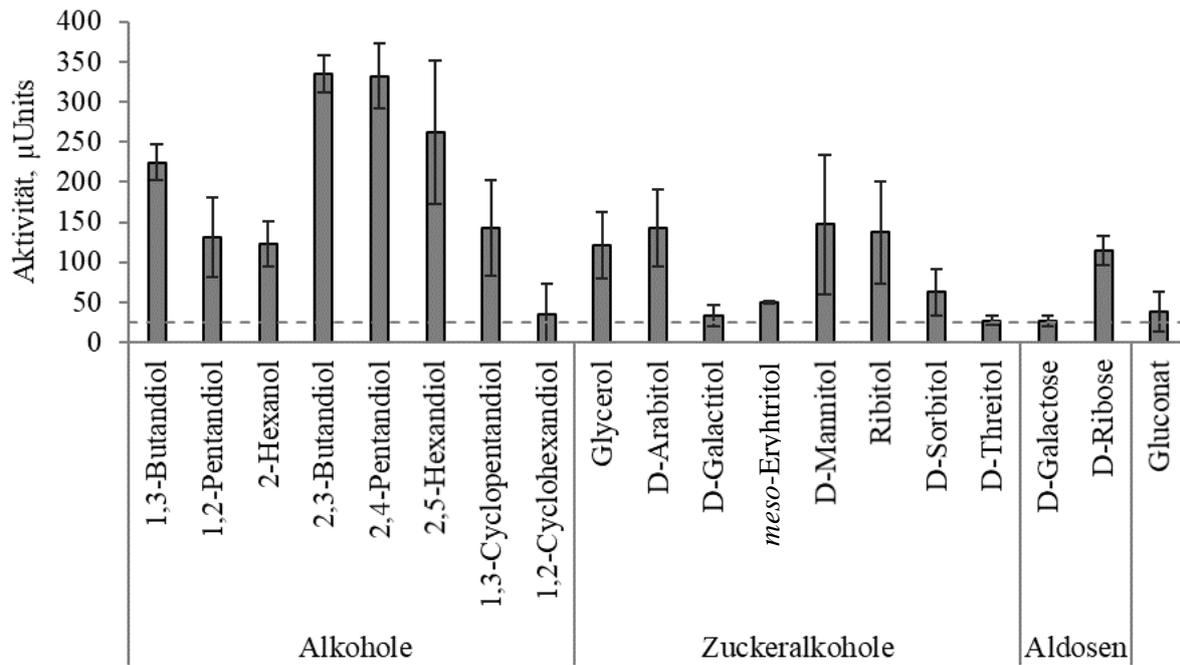
**Abbildung 3-14.** Verlauf der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Gluconat in Biotransformationen über 24 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen. Expression der *sldAB*-Gene erfolgte auf dem Expressionsplasmid pMM3b mit dem Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenase in BP.9. —■— BP.9 pMM4a-mSldAB, —■— BP.9 pADH-sldAB\_Gal, --□-- BP.9 pADH-sldAB2\_3504.  $c_{D-Gluconat} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 5, 67 mM  $KH_2PO_4$ . 3-4 Replikate

10 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat in Schikanekolben inkubiert (Kapitel 2.3.8). Die Proben wurden über einen Zeitraum von 24 h entnommen und mittels HPLC analysiert (Kapitel 2.4.3). Die Auswertung der Proben zeigte keine Veränderung der Gluconat-Konzentration im Lauf der Biotransformation (nicht abgebildet) und nur eine sehr geringe Bildung von 5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-14). Die maximale Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat von 0,3 g L<sup>-1</sup> wurde nach 8 h Inkubation mit BP.9 pMM4a-mSldAB erreicht (Tabelle 3-10). Mit BP.9 pADH-sldAB\_Gal und BP.9 pADH-sldAB2\_3504 wurden nur maximal 0,2 g L<sup>-1</sup> 5-Keto-D-Gluconat gebildet (Tabelle 3-10). Für die drei verbliebenen Stämme konnte unter diesen Bedingungen keine Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

**Tabelle 3-10.** Produktausbeute an 5-Keto-D-Gluconat nach 8 h und 24 h durch Expression von Polyol Dehydrogenasen mit Expressionsplasmid in Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9. Versuche wurden mit 10 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat in 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit pH 5 und mindestens in Triplikaten durchgeführt.

	5-Keto-D-Gluconat (g L <sup>-1</sup> )	
	8 h	24 h
BP.9 pMM4a-mSldAB	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3
BP.9 pADH-sldAB_Gal	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,3
BP.9 pADH-sldAB2_3504	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1

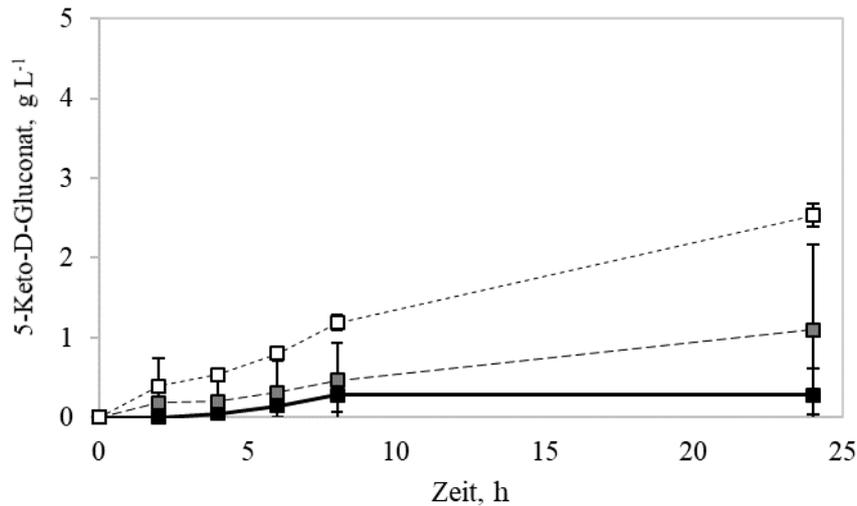
Als Alternative zu Polyol Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien wurde zusätzlich eine sekundäre Alkohol Dehydrogenase aus *X. campestris* DSM 3586 untersucht, die schon in früheren Studien für die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat in *G. oxydans* überexprimiert wurde (Yuan et al. 2016b). Die Verifizierung der sekundären Alkohol Dehydrogenase als membranständige Dehydrogenase erfolgte wie zuvor mithilfe von Datenbanken und bioinformatischer Anwendungen zur Vorhersage von Proteinstrukturen (Kapitel 2.5.1 und Tabelle 6-1). Zur Charakterisierung der sekundären Alkohol Dehydrogenase wurde der ORF von *gcd\_XC3586* in das Plasmid pMM3b *downstream* des Promotors der membranständigen Alkohol Dehydrogenase kloniert. Das Plasmid-Fragment pMM3b\_V1 wurde durch eine präparative PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase und den Primern pADHuniV1\_for / \_rev aus pMM3b amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1). Das Gen *gcd\_XC3586* (XCC\_RS08225) wurde mit dem Primer-Paar *gcd\_xc3586\_for* / \_rev (Tabelle 6-2) durch eine präparative PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase vervielfältigt (Kapitel 2.2.5.1). Die Ligation der Fragmente in einer SLiCE-Reaktion (Kapitel 2.2.8) wurde durch etwa 20 bp lange Überhänge an den Gen-spezifischen Primern komplementär zum 3'- bzw. 5'-Ende des Plasmid-Fragments ermöglicht. Nach Transformation des resultierenden Expressionsplasmids pADH-gcd\_XC3586 in *E. coli* (Kapitel 2.3.3) wurde das Plasmid durch triparentale Konjugation in den



**Abbildung 3-15.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) von BP.9 pADH-gcd\_XC3586 in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber verschiedenen Substraten. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von 25  $\mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3 Replikate

Multideletionsstamm BP.9 eingebracht (Kapitel 2.3.5). Der entstandene Expressionsstamm BP.9 pADH-gcd\_XC3586 wurde in Ganzzell-DCPIP-Assays mit 43 Substraten charakterisiert (Tabelle 6-4), um ein Bild des Substratspektrums der membranständigen Dehydrogenase zu erhalten (Abbildung 3-15). Insgesamt wurden 19 Substrate aus den Gruppen der gemischten, sekundären und zyklischen Alkohole, Zuckeralkohole, Aldosen und D-Gluconat von der Gcd\_XC3586 oxidiert. Ihr Substratspektrum ähnelte damit deutlich dem der zuvor charakterisierten Polyol Dehydrogenasen (Abbildung 3-3 bis Abbildung 3-4). D-Gluconat wurde mit einer durchschnittlichen Aktivität von 35  $\mu\text{Units}$  oxidiert, die Differenz der Aktivitäten war jedoch nicht signifikant. Im weiteren Verlauf wurde daher die native Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H ausgewählt, um verschiedene Bedingungen für die Oxidation von D-Gluconat auszutesten und diese Parameter zu optimieren.

Der Einfluss der anfänglichen D-Gluconat-Konzentration auf die Biotransformation wurde mit ruhenden Zellen von BP.9 pMM4a-mSldAB unter den zuvor beschriebenen Bedingungen mit 20  $\text{g L}^{-1}$  und 40  $\text{g L}^{-1}$  D-Gluconat untersucht und mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit 10  $\text{g L}^{-1}$  D-Gluconat verglichen. Die Ansätze wurden ebenfalls über 24 h inkubiert und die Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat mittels HPLC-Analytik bestimmt (Kapitel 2.4.3). Während in den vorherigen Versuchen nach 24 h Inkubation aus 10  $\text{g L}^{-1}$  D-Gluconat mit BP.9 pMM4a-mSldAB eine maximale Konversionsrate von 3 % 5-Keto-D-Gluconat gebildet wurde, konnte die Konversionsrate zu 5-Keto-D-Gluconat bei



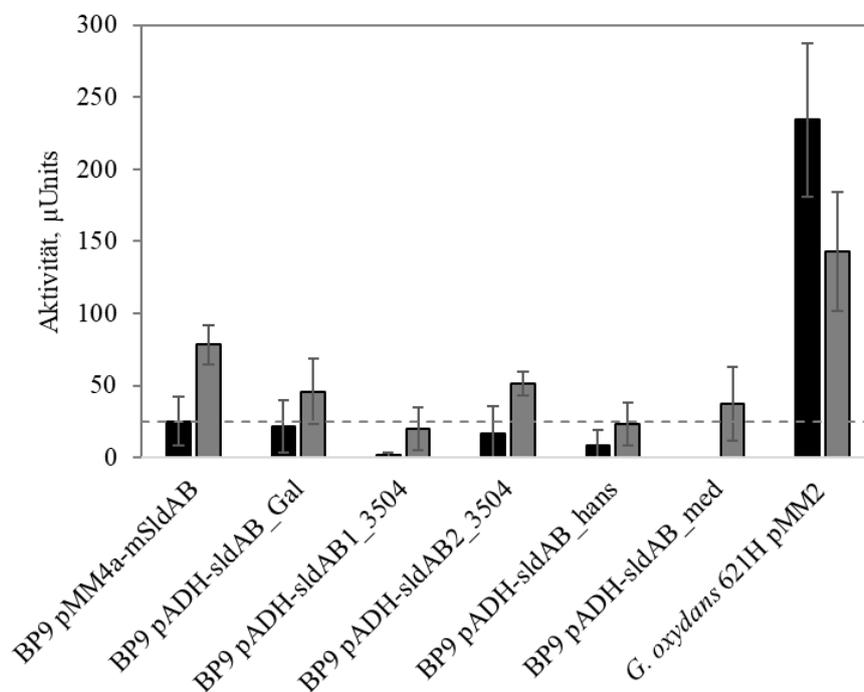
**Abbildung 3-16.** Verlauf der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus unterschiedlichen D-Gluconat-Konzentrationen in Biotransformationen über 24 h mit ruhenden Zellen von BP.9 pMM4a-mSldAB. —■— 10 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat, -■- 20 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat, -□- 40 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat. OD<sub>600</sub> = 0,4, pH 5, 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 3 Replikate

anfänglichen 20 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat auf 5,5 % und mit 40 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat auf 6,25 % gesteigert werden (Abbildung 3-16).

Als zweiter Parameter wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Oxidation des D-Gluconats untersucht. Da in vielen Studien ein pH-Wert zwischen 4,5 und 5 für die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat angegeben wurde (Elfari et al. 2005; Merfort et al. 2006a; Yuan et al. 2016a; Krajewski et al. 2010), wurden die ersten Versuche zur Oxidation von D-Gluconat durch Polyol Dehydrogenasen bei pH 5 durchgeführt (Abbildung 3-14). Das pH-Optimum für Polyol Dehydrogenasen für die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat liegt jedoch laut anderer Studien bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 4,5 (Matsushita et al. 2003; Ano et al. 2011; Yuan et al. 2016a). Nachdem erste Biotransformationen bei pH 5 keine erwünschten Ergebnisse lieferten, wurde die Aktivität aller charakterisierter Polyol Dehydrogenasen und dem Referenzstamm *G. oxydans* 621H mit dem Kontrollplasmid pMM2 (*G. oxydans* 621H pMM2) gegenüber D-Gluconat zusätzlich in Ganzzell-DCPIP-Assays mit dem McIlvaine Puffer bei pH 4 bestimmt. Die Ergebnisse wurden zusammen mit den bereits in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Aktivitäten der Polyol Dehydrogenasen in 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer mit pH 5 in Abbildung 3-17 zusammengefasst, um die Aktivität der Polyol Dehydrogenasen zu vergleichen. Hier zeigte sich, dass durch Verwendung des geringeren pH-Wertes von 4 im McIlvaine Puffer im Vergleich zum KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer mit pH 5 die oxidative Aktivität in allen Expressionsstämmen gesteigert wurde. Für die Stämme BP.9 pMM4a-mSldAB, BP.9 pADH-sldAB\_Gal, BP.9 pADH-sldAB2\_3504 und BP.9 pADH-sldAB\_med wurde dabei im Mittel eine höhere Aktivität als der festgesetzte Schwellenwert von 25 μUnits nachgewiesen, der in Tests mit einem pH von 5 nicht erreicht wurde. Die höchste Aktivität

von etwa 80  $\mu$ Units, die mit dem Stamm BP.9 pMM4a-mSldAB gemessen wurde, betrug dabei das Dreifache der oxidativen Aktivität desselben Stammes bei einem pH-Wert von 5 (Abbildung 3-17). Die oxidative Aktivität des Referenzstammes *G. oxydans* 621H pMM2 nahm dagegen bei dem geringeren pH-Wert von 4 im McIlvaine Puffer gegenüber dem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer mit pH 5 um etwa 40 % ab.

Für eine Ganzzellkatalyse für die Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose waren jedoch auch das pH-Optimum der membranständigen Glucose Dehydrogenase entscheidend, da diese die erste Teilreaktion katalysierte. Durch die Durchführung der Biotransformationen in Schüttelkolben konnte der pH-Wert während der Versuche nicht kontrolliert werden. Frühere Studien beschrieben die Oxidation von D-Glucose durch die membranständige Glucose Dehydrogenase bei pH 5 bis 6 mit einer parallelen Ansäuerung des Mediums bzw. des verwendeten Puffers durch Bildung von D-Gluconat (Ameyama et al. 1981a; Sará-Páez et al. 2015). Der pH wurde dabei bei einem anfänglichen Wert von pH 5 bis 6 auf einen pH-Wert zwischen 3 und 4 abgesenkt (Weenk et al. 1984; Cleton-Jansen et al. 1991; Silberbach et al. 2003; Yuan et al. 2016b). Es wurde daher angenommen, dass sich bei gemeinsamer Expression der membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase während der ersten Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat der pH-Wert des Mediums an das pH-Optimum der Polyol Dehydrogenase annäherte und ausreichende Bedingungen für die Gluconat-Oxidation vorliegen



**Abbildung 3-17.** Vergleich der Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener Polyol Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber D-Gluconat in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten. *G. oxydans* 621H pMM2 diente als Referenzstamm. ■ 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 5, ▒ McIlvaine-Puffer mit pH 4. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von 25  $\mu$ Units.  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{D-Gluconat} = 25$  mM; 3-6 Replikate

würden. In folgenden Experimenten wurde deshalb bei Biotransformationen zur Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose mit Stämmen, in denen eine membranständige Glucose und Polyol Dehydrogenase parallel exprimiert wurden, der pH auf einen Wert von 5 eingestellt.

### **3.4.3 Kombinationen von membranständigen Glucose und Polyol-Dehydrogenasen zur Produktion von 5-Keto-D-Gluconat**

Um den gesamten Prozess der Oxidation der D-Glucose über D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat zu untersuchen, wurden zunächst die *SldAB\_621H* und die *mGDH\_621H* bzw. die *mGDH1\_3504* gemeinsam auf dem Plasmid *pMM3b* mit unterschiedlichen Promotoren exprimiert und die Oxidation von D-Glucose und D-Gluconat bestimmt. Anschließend wurde die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat durch chromosomale Expression der Polyol Dehydrogenase und membranständigen Glucose Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H untersucht.

#### **Plasmid-basierte Expression der membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen**

Die Überexpression einer membranständigen Polyol und einer Glucose Dehydrogenase auf einem Plasmid wurde mit der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H und der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H oder *G. oxydans* DSM 3504 getestet. Zunächst wurde die Expression und Aktivität der beiden nativen Dehydrogenasen aus *G. oxydans* 621H im Multideletionsstamm BP.9 untersucht. Dazu erfolgte die Insertion des ORFs von *mgdh\_621H* mit seinem nativen Promotor mit verschiedenen Längen (*pmGDH* bzw. *pLmGDH*) oder unterschiedlich langer Versionen des Promotors der Gluconat-2-Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H (*pG2DH* bzw. *pLG2DH*) in das Plasmid *pMM4a-mSldAB*. Die Expression der *sldAB*-Gene wurde in *pMM4a-mSldAB* durch den Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H (*pADH*) kontrolliert. Alle hierfür verwendeten Oligonukleotide wurden in Tabelle 6-2 zusammengefasst. Für die Konstruktion der Plasmide wurde das *pADH-sldAB* Fragment mit 7811 bp als Plasmid-Rückgrat in einer präparativen PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Kapitel 2.2.5.1) mit dem Plasmid *pMM4a-mSldAB* als Template und dem Primer-Paar *pADH\_Amp2\_for* / *\_rev* amplifiziert. Um das *mgdh*-Gen aus *G. oxydans* 621H mit dem Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase in das Plasmid *pMM4a-mSldAB* zu integrieren, wurde das *mgdh*-Gen mit den Primer-Paar *GOX02475\_exG2DH\_for* und *GOX02475\_rev* in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase vervielfältigt (Kapitel 2.2.5.1). Eine kürzere und eine längere Version des Promotors der membranständigen Gluconat-2-Dehydrogenase mit 191 bp bzw. 326 bp wurde ebenfalls in einer präparativen PCR mit den Primer-Paaren *promG2DH\_for* bzw. *LpromG2DH\_for* und *promG2DH\_rev* amplifiziert. Als Template diente in beiden Fällen die genomische DNA von *G. oxydans* 621H. Durch

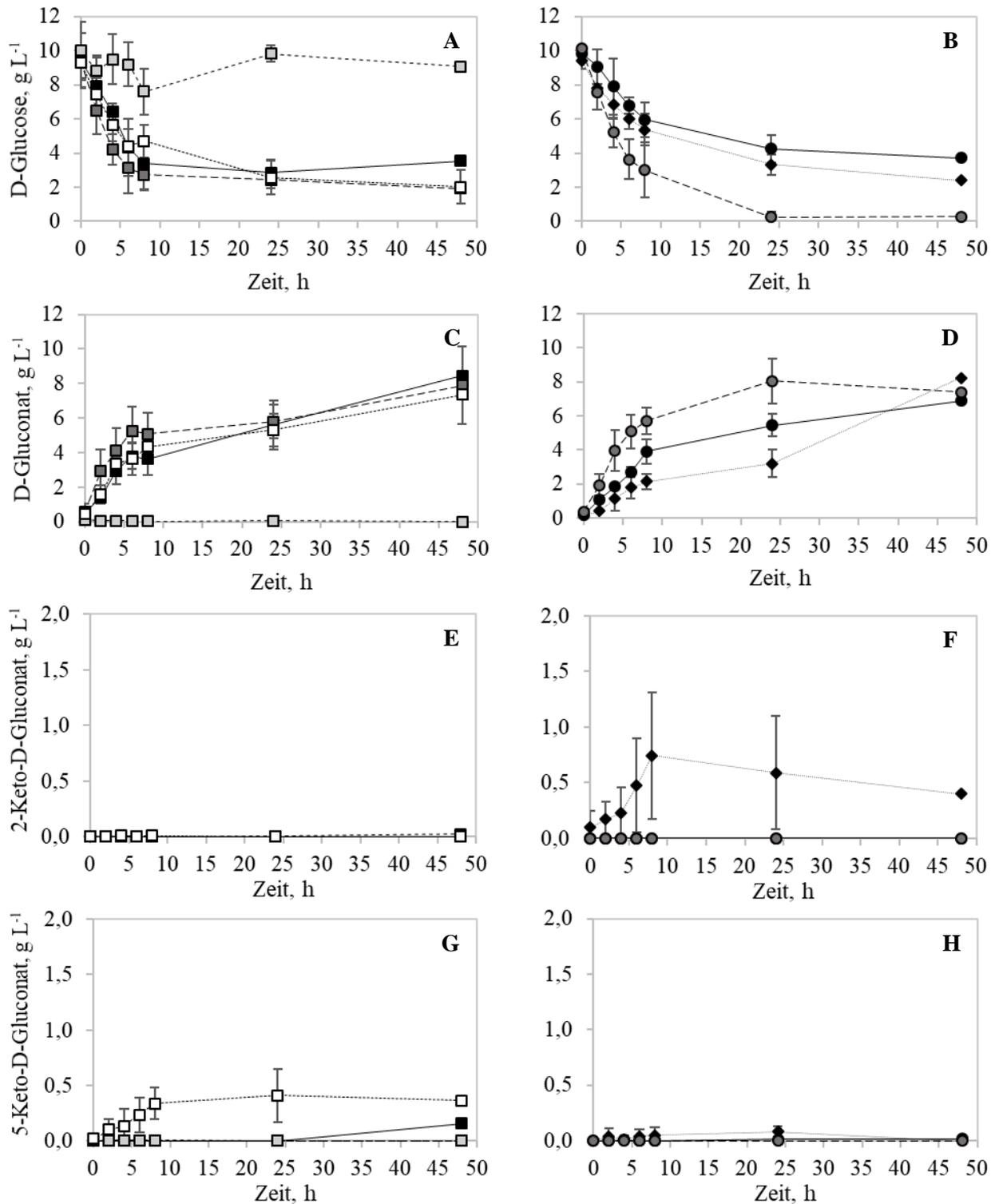
Ligation der Fragmente mit der SLiCE-Klonierungsmethode (Kapitel 2.2.8) entstanden die Plasmide pADH-sldAB\_pG2DH-mGDH und pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH. Um das Gen *mgdh\_621H* mit seinem nativen Promotor in das Plasmid pMM4a-mSldAB zu integrieren, wurde es zusammen mit seinem nativen Promotor aus der genomischen DNA von *G. oxydans* 621H mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase und den Primer-Paaren promGDH\_621H\_for und GOX02475\_rev bzw. LpromGDH\_621H\_for und GOX02475\_rev in einer präparativen PCR amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1). Die Promotoren hatten dabei eine Länge von 150 bp und 219 bp. Durch eine anschließende Ligation durch die SLiCE-Klonierungsmethode (Kapitel 2.2.8) wurden die Fragmente zu den Plasmiden pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH und pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH ligiert.

Bei der Überexpression der membranständigen Glucose Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 mit der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H wurde der ORF von *mgdh1\_3504* in das Plasmid pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH inseriert, wo es das Gen *mgdh\_621H* ersetzte. Das Plasmid-Rückgrat wurde dazu mit pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH als Template und dem Primer-Paar pADH\_Amp2\_for und pMM3b-Amp3\_rev durch eine präparative PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase vervielfältigt (Kapitel 2.2.5.1). Das Gen *mgdh1\_3504* wurde mit der genomischen DNA aus *G. oxydans* DSM 3504 als Template und GDH1\_3504\_2\_for / \_rev als Primer-Paar in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1). Durch Ligation der Fragmente durch die SLiCE-Klonierungsmethode entstand das Plasmid pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH1\_3504 3504 (Kapitel 2.2.8). Als zweite Variante zur Expression der mGDH1\_3504 in Kombination der SldAB\_621H wurde der ORF der *sldAB\_621H*-Gene mit ihrem nativen Promotor (pSldAB) in das Plasmid pADH-mGDH1\_3504 inseriert. Das Plasmid-Rückgrat wurde dazu mit dem Plasmid pADH-mGDH1\_3504 als Template und dem Primer-Paar pADH\_Amp2\_for / \_rev in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase vervielfältigt (Kapitel 2.2.5.1). Die *sldAB*-Gene wurden zusammen mit ihrem nativen Promotor ebenfalls in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase aus der genomischen DNA von *G. oxydans* 621H mit dem Primer-Paar PromsldAB\_sldAB\_for / \_rev amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1). Durch Ligation der Fragmente mit der SLiCE-Klonierungsmethode entstand das Plasmid pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504 (Kapitel 2.2.8). Die konstruierten Plasmide wurden durch Hitzeschocktransformation in *E. coli* eingebracht und anschließend durch triparentale Konjugation auf den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 übertragen (Kapitel 2.3.3 und 2.3.5). Eine Übersicht und Beschreibung aller hier erstellten Stämme finden sich in Tabelle 3-11.

**Tabelle 3-11.** Konstruierte BP.9-Expressionsstämme, die eine membranständige Polyol- und Glucose Dehydrogenase aus verschiedenen Essigsäurebakterien exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften
BP.9 pADH-sldAB_ pG2DH-mGDH	Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>g2dh</i> -Promotor
BP.9 pADH-sldAB_ pLG2DH-mGDH	Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit verlängerten <i>g2dh</i> -Promotor
BP.9 pADH-sldAB_ pmGDH-mGDH	Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit nativem Promotor
BP.9 pADH-sldAB_ pLmGDH-mGDH	Derivat von pMM3b; Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> (GOX_RS02475) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit verlängertem nativem Promotor
BP.9 pADH-sldAB_ pLmGDH-mGDH1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit <i>madh</i> -Promotor und der <i>mgdh</i> 1 (GLS_c02870) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit verlängertem <i>mgdh</i> -Promotor aus <i>G. oxydans</i> 621H
BP.9 pSldAB-sldAB_ pADH-mGDH1_3504	Derivat von pMM3b; Expression der <i>sldAB</i> (GOX_RS5400-05) aus <i>G. oxydans</i> 621H mit nativem Promotor und der <i>mgdh</i> 1 (GLS_c02870) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit <i>madh</i> -Promotor

Die Effizienz der konstruierten Ganzzellbiokatalysatoren mit Plasmid-basierter Expression einer membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase im Multideletionsstamm BP.9 zur Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose wurde durch Biotransformationen mit ruhenden Zellen in Schüttelkolben bestimmt (Kapitel 2.3.8). Dazu wurden ruhende Zellen der einzelnen Stämme mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose über 24 h inkubiert und die Proben mittels HPLC analysiert (Kapitel 2.4.3). Der Verlauf der Oxidation und Bildung der Produkte über den Versuchszeitraum sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Die jeweiligen Substratumsätze, Produktausbeuten und spezifischen Produktausbeuten ( $Y_{P(\text{gesamt})/S}$ ) der einzelnen Stämme nach 6 h Inkubation wurden in Tabelle 3-12 zusammengefasst. Für fast alle getesteten Stämme konnte eine Oxidation der eingesetzten D-Glucose zu D-Gluconat nach Start der Versuche nachgewiesen werden (Abbildung 3-18 A bis D). Nur der Stamm BP.9 pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH, der die mGDH\_621H mit der kürzeren Version ihres nativen Promotors exprimierte, zeigte keine Umsetzung von D-Glucose oder Bildung von D-Gluconat (Abbildung 3-18 A und C). Die höchste Aktivität der mGDH\_621H gegenüber D-Glucose wurde mit dem Expressionsstamm BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH gemessen, der bereits nach 8 h



**Abbildung 3-18.** Verlauf der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose in Biotransformationen über 24 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen. Expression der *mgdh*- und *sldAB*-Gene erfolgte auf dem Expressionsplasmid pMM3b mit unterschiedlichen Promotoren in BP.9. Als Referenzstamm diente *G. oxydans* 621H pMM2. A und B: Umsetzung der D-Glucose; C und D: Bildung von D-Gluconat; E: Bildung von 2-Keto-D-Gluconat; F: Bildung von 5-Keto-D-Gluconat; —■— BP.9 pADH-sldAB\_pG2DH-mGDH, —■— BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH, -□- BP.9 pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH, --□-- BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH, —●— BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH1\_3504, —●— BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504, .....◆..... *G. oxydans* 621H pMM2.  $C_{D-Glucose} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 5, 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . 3 – 6 Replikate

Inkubationszeit etwa  $7 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose verbraucht und  $5 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat gebildet hatte (Abbildung 3-18 A und C). Für die mGDH1\_3504 wurde mit dem Stamm BP.9 pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH1\_3504 die höchste Aktivität gegenüber D-Glucose mit einem Umsatz von ebenfalls ca.  $7 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose und einer Produktion von  $5,7 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat nach 8 h gezeigt (Abbildung 3-18 B und D). Der Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 setzte in 8 h nur etwa  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose um und produzierte ca.  $2 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat (Abbildung 3-18 B und D). Mit den Stämmen BP.9 pADH-sldAB\_pG2DH-mGDH, BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH, BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH und BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504 war damit die Bildung von D-Gluconat gegenüber dem Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 über den gesamten Zeitraum von 24 h signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test). Das Nebenprodukt 2-Keto-D-Gluconat wurde wie erwartet nur von *G. oxydans* 621H pMM2 gebildet, da in den Expressionsstämmen die verantwortliche Gluconat-2-Dehydrogenase deletiert wurde (Abbildung 3-18 E und F). Eine Produktion von 5-Keto-D-Gluconat konnte nur für *G. oxydans* 621H pMM2 und BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH gezeigt werden. Der Referenzstamm produzierte dabei  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat innerhalb von 24 h. Mit dem Expressionsstamm BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH wurden insgesamt  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat nachgewiesen (Abbildung 3-18 G und H). Durch Verwendung von BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH wurde damit für die Messpunkte nach 6 h und 8 h Inkubation gegenüber *G. oxydans* 621H pMM2 eine signifikante Steigerung der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat nachgewiesen ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test). Die Konversionsrate, die Produktausbeuten und die spezifischen Produktausbeuten  $Y_{P(\text{gesamt})/S}$  des Gesamtprozesses in Tabelle 3-12 wurden nach 6 h Inkubation bestimmt, da bei vielen Stämmen die Oxidation von D-Glucose und Produktion von D-Gluconat zu diesem Zeitpunkt bereits stagnierte (Abbildung 3-18). Zur Berechnung der spezifischen Produktausbeute  $Y_{P(\text{gesamt})/S}$  wurden alle gebildeten Produkte berücksichtigt. Die Stämme BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH und BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504 zeigten auch hier die höchsten Konversionsraten von D-Glucose mit 55,9 % und 50,3 %, mit einer spezifischen Produktausbeute von etwa 0,8 bei beiden Stämmen. Die höchste Ausbeute an D-Gluconat mit  $5,3 \text{ g L}^{-1}$  wurde folglich auch mit BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH erreicht. Jedoch konnte mit diesem Stamm keine Produktion von 5-Keto-D-Gluconat gemessen werden. Für *G. oxydans* 621H pMM2 wurde die geringste Ausbeute an D-Gluconat mit  $1,8 \text{ g L}^{-1}$  und die niedrigste spezifische Produktausbeute  $Y_{P(\text{gesamt})/S}$  von 0,56 ermittelt. *G. oxydans* 621H pMM2 bildete neben 2-Keto-D-Gluconat auch eine geringe Menge an 5-Keto-D-Gluconat (Tabelle 3-12). Die höchste Ausbeute an 5-Keto-D-Gluconat mit  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  wurde aber für BP.9 pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH ermittelt, der eine Gluconat-Ausbeute von nur  $3,6 \text{ g L}^{-1}$  aufwies (Tabelle 3-12).

**Tabelle 3-12.** Konversionsrate von D-Glucose, Produktausbeute und spezifische Produktausbeute  $Y_{P(\text{gesamt})/S}$  nach 6 h durch Expression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen und der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H auf einem Expressionsplasmid im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 von Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2. Versuche wurden mit 10 g L<sup>-1</sup> D-Glucose in 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit pH 5 und mindestens in Triplikaten durchgeführt.

	Konversions- rate (%)	Produktausbeute (g L <sup>-1</sup> )			$Y_{P(\text{gesamt})/S}$ (g g <sup>-1</sup> )
		D-Gluconat	2KG	5KG	
<i>G. oxydans</i> 621H pMM2	24,2	1,8 ± 0,7	0,5 ± 0,4	-	0,56
BP.9 pADH-sldAB_pG2DH-mGDH	40,1	3,8 ± 0,7	-	-	1,04
BP.9 pADH-sldAB_pLmGDH-mGDH	55,9	5,3 ± 1,4	-	-	0,82
BP.9 pADH-sldAB_pmGDH-mGDH	-	-	-	-	-
BP.9 pADH-sldAB_pLmGDH-mGDH	41,9	3,6 ± 1,0	-	0,2 ± 0,2	0,87
BP.9 pADH-sldAB_pLmGDH- mGDH1_3504	27,4	2,7 ± 0,1	-	-	0,88
BP.9 pSldAB-sldAB_pADH- mGDH1_3504	50,3	5,1 ± 0,3	-	-	0,78

2KG: 2-Keto-D-Gluconat; 5KG: 5-Keto-D-Gluconat

### Chromosomale Expression der membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen

Wie bereits zuvor für die Produktion von L-Erythrose wurde auch für die Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat eine stabile Expression der für die Katalyse benötigten membranständigen Dehydrogenasen vom Chromosom getestet, da dadurch die Verwendung von Antibiotika zur Erhaltung von Expressionsplasmiden für den Einsatz von Ganzzellkatalysatoren in industriellen Prozessen vermieden werden kann. Daher wurden die Expression der *mgdh*- und *sldAB*-Gene aus *G. oxydans* 621H von verschiedenen Loci und mit unterschiedlichen Promotoren für eine Ganzzellkatalyse zur Oxidation von D-Glucose zu 5-Keto-D-Gluconat getestet. In den vorangegangenen Experimenten mit Expressionsplasmiden wurden für die *mgdh\_621H* die besten Ergebnisse in Kombination mit dem nativen Promotor (BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH) und für die *mgdh1\_3504* in Verbindung mit dem Promotor der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504) erzielt. Daher wurden Integrationsmutanten konstruiert, in denen die *sldAB\_621H*-Gene und die *mgdh\_621H* beide in ihrem nativen Locus (BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_621H$ ) oder die *sldAB\_621H*-Gene in ihrem nativen Locus und die *mgdh1\_3504* im Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (BP.8  $\Delta madh::mgdh1_3504$ ) exprimiert wurden. Die Insertion der jeweiligen *mgdh*-Gene erfolgte mithilfe des markerfreien *codBA*-Systems in den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8, in dem die Polyol Dehydrogenase von ihrem nativen Locus exprimiert wurde (Kapitel 2.3.6). Die hierfür verwendeten Oligonukleotide wurden in Tabelle 6-3 zusammengefasst. Zur Konstruktion des Insertionsplasmids pKOS6b-InsGDH621H\_LocGDH für die Reintegration des ORFs des *mgdh\_621H*-Gens in seinen nativen Locus in BP.8 wurde das Plasmid pKOS6b mit dem Primer-Paar

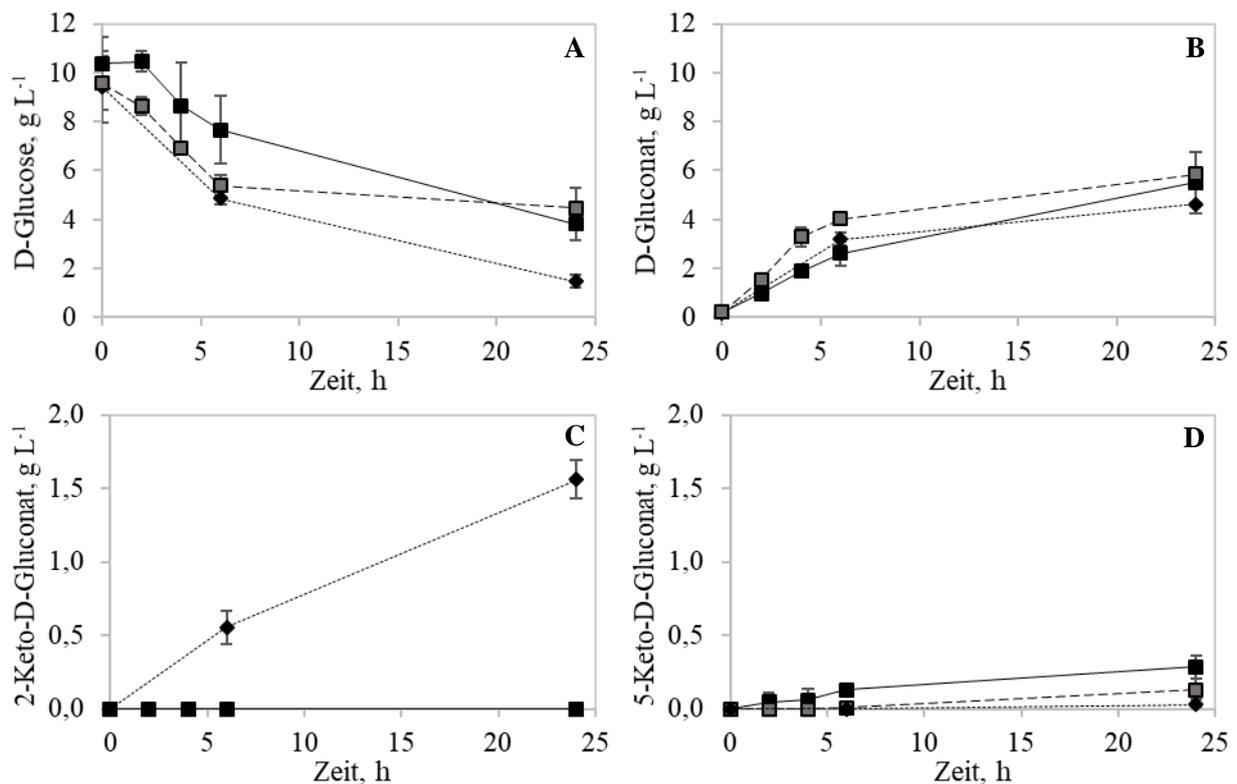
PlasmidbackboneIns1\_for / \_rev, in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert (Kapitel 2.2.5.1). Das Gen *mgdh\_621H* (GOX\_RS02475) und die Flanken wurden ebenfalls in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase mit den Primer Paaren GDHins1\_for / \_rev, Flanke1ins1\_for / \_rev und Flanke2ins1\_for / \_rev aus der genomischen DNA von *G. oxydans* 621H vervielfältigt. Das Insertionsplasmid pKOS6b\_InsGDH1\_3504\_LocADH diente zur Insertion des ORFs des *mgdh1\_3504*-Gens in den Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase (GOX\_RS06485-90) in BP.8. Das Plasmid-Fragment wurde aus dem Plasmid pKOS6b in einer präparativen PCR mit dem Primer-Paar pKOS\_InssldAB2\_3504\_2\_for / \_rev und der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase vervielfältigt. Das Gen *mgdh1\_3504* (GLS\_RS01440) und die Flanken der membranständigen Alkohol Dehydrogenase wurden ebenfalls in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Die Flanken wurden mit den Primer Paaren adh621H\_up\_for und ins2\_adh621H\_up\_rev bzw. ins2\_adh621H\_down\_for und adh621H\_down\_rev aus der genomischen DNA von *G. oxydans* 621H vervielfältigt. Das Gen *mgdh1\_3504* wurden mit den Primern ins2\_GDH1\_3504\_for / \_rev aus der genomischen DNA von *G. oxydans* DSM 3504 amplifiziert. Die einzelnen Fragmente der Plasmide wurden mit der SLiCE-Klonierungsmethode ligiert (Kapitel 2.2.8) und in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.3.3). Nach der triparentalen Konjugation in BP.8 (Kapitel 2.3.5) wurden die Integrationsmutanten BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_621H$  und BP.8  $\Delta madh::mgdh1_3504$  nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode selektiert. Die verwendeten Insertionsplasmide finden sich in Tabelle 2-4. Die erhaltenen Stämme sind in Tabelle 3-13 zusammengefasst.

**Tabelle 3-13.** Konstruierte Insertionsmutanten für die Expression von Polyol-Dehydrogenasen in Multideletionsstämmen von *G. oxydans* 621H

Stamm	Eigenschaften
BP.8 $\Delta mgdh::mgdh_621H$	BP.9 mit Insertion der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus <i>G. oxydans</i> 621H (GOX_RS02475) in ihren nativen Locus
BP.8 $\Delta madh::mgdh1_3504$	BP.9 mit Insertion der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 (GLS_c02870) in den Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase

Die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat durch chromosomale Expression einer membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase in Multideletionsstämmen von *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* 621H als Kontrollstamm wurde in Biotransformationen mit ruhenden Zellen in Schüttelkolben mit 10 g L<sup>-1</sup> D-Glucose untersucht (Kapitel 2.3.8). Die Proben wurden über 24 h entnommen und mittels HPLC Analyse ausgewertet (Kapitel 2.4.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-19 dargestellt. Es zeigte

sich, dass *G. oxydans* 621H und BP.8  $\Delta madh::mgdh1_{3504}$  D-Glucose deutlich schneller verbrauchten als BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  und nach 6 h bereits etwa  $5 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose umgesetzt hatten (Abbildung 3-19 A). BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  oxidierte dagegen im gleichen Zeitraum nur etwa  $3 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose (Abbildung 3-19 A). Dies zeigte sich auch an den Konversionsraten von D-Glucose, die für *G. oxydans* 621H und BP.8  $\Delta madh::mgdh1_{3504}$  etwa 40 % betrug, für BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  dagegen nur etwa 27 % (Tabelle 2-1). Während nach 24 h die eingesetzte D-Glucose von allen Stämmen zu einem großen Teil umgesetzt wurde, verringerte sich die Bildung von D-Gluconat nach 6 h Inkubation bei *G. oxydans* 621H und BP.8  $\Delta adh::GDH1_{3504}$  (Abbildung 3-19 B). Dennoch konnte die Gluconat-Produktion durch die Verwendung der Insertionsmutante BP.8  $\Delta madh::mgdh_{3504}$  im Vergleich zu *G. oxydans* 621H in den ersten 6 h der Biotransformation von 30 % auf 40 % signifikant gesteigert werden ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Tabelle 3-14). Vergleicht man die Ausbeuten an D-Gluconat von BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  mit denen von *G. oxydans* 621H konnte keine Verbesserung der Gluconat-Produktion durch den Einsatz der Insertionsmutante festgestellt werden (Abbildung 3-19 B und Tabelle



**Abbildung 3-19.** Verlauf der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose in Biotransformationen über 24 h mit ruhenden *G. oxydans* Zellen. Expression der *mgdh*- und *sldAB*-Gene erfolgte chromosomal auf verschiedenen Loci in BP.8 und BP.9. Als Referenzstamm diente *G. oxydans* 621H. A: Umsetzung der D-Glucose; B: Bildung von D-Gluconat; C: Bildung von 2-Keto-D-Gluconat; D: Bildung von 5-Keto-D-Gluconat; —■— BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$ , -■- BP.8  $\Delta madh::mgdh1_{3504}$ , ---◆--- *G. oxydans* 621H.  $C_{D-Glucose} = 10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $OD_{600} = 0,4$ , pH 5, 67 mM  $KH_2PO_4$ .

3-14). Bei Betrachtung der spezifischen Produktausbeute  $Y_{P(\text{gesamt})/S}$  zeigte sich jedoch eine höhere Ausbeute an D-Gluconat gemessen an der verbrauchten D-Glucose für beide Insertionsmutanten (Tabelle 3-14). *G. oxydans* 621H bildete außerdem  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  des Nebenproduktes 2-Keto-D-Gluconat und nur etwa  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat innerhalb von 24 h (Abbildung 3-19 C und D). Für die Insertionsmutanten wurde wie erwartet keine Produktion von 2-Keto-D-Gluconat gemessen (Abbildung 3-19 C und Tabelle 3-14). BP.8  $\Delta\text{madh}::\text{mgdh1}_{3504}$  produzierte jedoch innerhalb von 24 h insgesamt  $0,13 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat und BP.8  $\Delta\text{mgdh}::\text{mgdh}_{621H}$  sogar  $0,28 \text{ g L}^{-1}$ . Damit war die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat mit BP.8  $\Delta\text{mgdh}::\text{mgdh}_{621H}$  im Vergleich zu *G. oxydans* 621H über die gesamte Versuchsdauer erhöht ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test). Ähnlich wie zuvor wurde die Oxidation des D-Gluconats zu 5-Keto-D-Gluconat durch die chromosomale Expression der membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen in Multideletionsstämmen von *G. oxydans* 621H nicht maßgeblich gesteigert.

**Tabelle 3-14.** Konversionsrate von D-Glucose, Produktausbeute und spezifische Produktausbeute  $Y_{P(\text{gesamt})/S}$  nach 6 h durch chromosomale Expression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8 und von Wildtypstamm *G. oxydans* 621H. Versuche wurden mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  D-Glucose in  $67 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 5 und mindestens in Triplikaten durchgeführt.

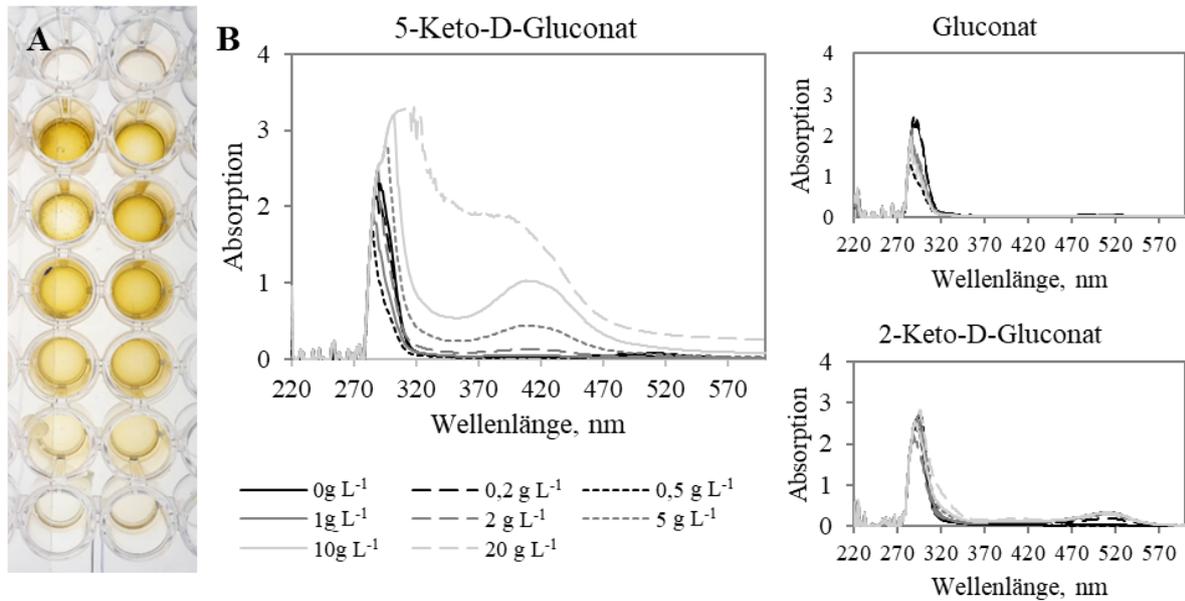
	Konversions- rate (%)	Ausbeuten ( $\text{g L}^{-1}$ )			$Y_{P(\text{gesamt})/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )
		D-Gluconat	2KG	5KG	
<i>G. oxydans</i> 621H	39,8	$3,2 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$	-	0,69
BP.8 $\Delta\text{mgdh}::\text{mgdh}_{621H}$	26,5	$2,6 \pm 0,5$	-	$0,1 \pm 0,03$	0,87
BP.8 $\Delta\text{madh}::\text{mgdh1}_{3504}$	42,3	$4,0 \pm 0,1$	-	-	0,82

Auch in ersten Ganzzell-DCPIP-Assays mit Multideletionsstämmen, die einzig die membranständige Polyol Dehydrogenase exprimierten, wurde nur eine geringe Aktivität der verwendeten Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H von etwa  $25 \mu\text{Units}$  erreicht (Abbildung 3-4). Allerdings wurde durch Verwendung eines McIlvaine Puffers eine Verbesserung der oxidativen Aktivität gegenüber D-Gluconat durch die Verringerung des pH-Wertes von 5 auf einen Wert von 4 nachgewiesen (Abbildung 3-17). Da in Schüttelkolben eine Regulierung des pH-Wertes auf einen konstanten Wert nicht möglich war, wurde eine Steigerung der 5-Keto-Gluconat Produktion durch Veränderung der Prozessparameter nicht weiter untersucht. Der Fokus der folgenden Untersuchungen lag daher auf der Verbesserung der oxidativen Aktivität der Polyol Dehydrogenasen durch Identifizierung effizienterer Katalysatoren oder Änderung der Affinität zu D-Gluconat.

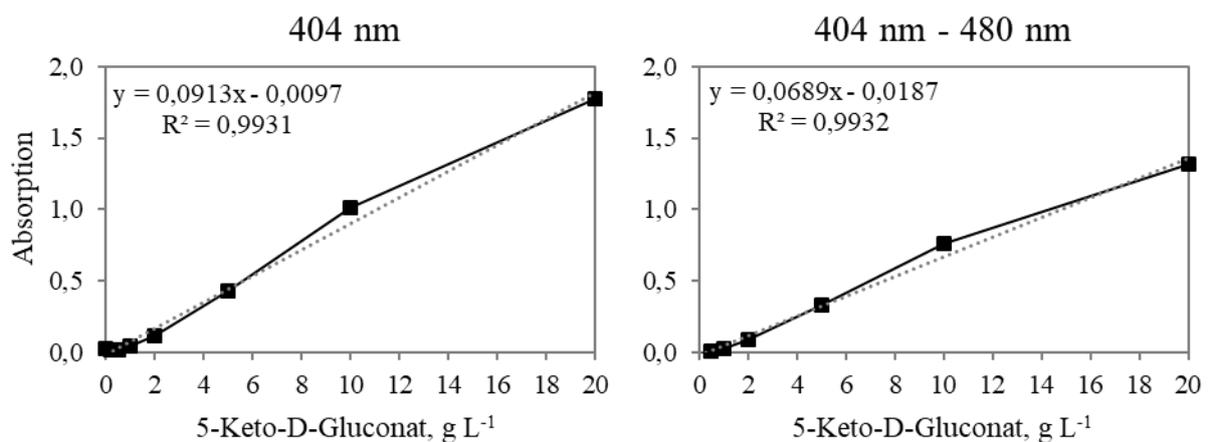
### 3.5 Entwicklung eines Screening-Verfahrens zum Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat

In vielen Essigsäurebakterien wird D-Gluconat durch zwei membranständige Dehydrogenasen oxidiert. Die Gluconat-2-Dehydrogenase bildet dabei 2-Keto-D-Gluconat und die Polyol Dehydrogenase 5-Keto-D-Gluconat. Jedoch variiert dieses Verhältnis von Stamm zu Stamm (Herrmann et al. 2004; Sainz et al. 2016). Das Verhältnis der beiden Oxidationsprodukte konnte deshalb in Ganzzell-DCPIP-Assays mit Wildtypstämmen nicht bestimmt werden, da hier nur die Oxidation des Gluconats gemessen werden konnte, jedoch nicht die entstandenen Produkte. Auch eine Analyse mittels HPLC-Analytik der Produkte in Wildtypstämmen oder eine Überexpression und Charakterisierung der Gluconat-Oxidation verschiedener Polyol Dehydrogenasen im Multideletionsstamm *G. oxydans* BP.9 wäre sehr arbeits- und zeitaufwendig gewesen. So wurde ein schnelles und sensitives Screening-Verfahren entwickelt, mit der die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat spezifisch und schnell nachgewiesen werden kann. Mit dessen Hilfe wurde anschließend zum einen die lehrstuhlinterne Stammsammlung an Essigsäurebakterien und zum anderen Varianten von mutagenisierten Polyol Dehydrogenasen auf ihre 5-Keto-D-Gluconat-Produktion hin überprüft, um ein hoch effizientes Enzym für die Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat zu identifizieren.

Für ein Screening zum Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat war vor allem die Unterscheidung der verschiedenen Gluconat-Derivate und damit die Differenzierung der Position der Keto-Gruppe am C2- bzw. C5-Atom entscheidend. Deshalb wurde ein Nachweisverfahren auf Grundlage einer Farbreaktion von Aldohexosen mit Resorcinol verwendet (Seliwanoff 1887). Erste Tests wurden mit unterschiedlich konzentrierten Reinsubstanzen von 5-Keto-D-Gluconat, 2-Keto-D-Gluconat, D-Gluconat und D-Fructose als Positivkontrolle nach der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Methode durchgeführt, um die Einsetzbarkeit der Seliwanoff-Probe für einen spezifischen Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat zu testen. Wie erwartet färbte sich die Positivkontrolle mit D-Fructose rot und der Ansatz mit D-Gluconat blieb farblos. Auch die Lösung mit 2-Keto-D-Gluconat blieb unverändert. Der Ansatz mit 5-Keto-D-Gluconat zeigte dagegen eine gelbe Färbung (Abbildung 3-20 A). Anschließend wurden die Absorptionsspektren von 220 nm bis 1000 nm der getesteten Proben mit 5-Keto-D-Gluconat, 2-Keto-D-Gluconat, D-Gluconat in einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar® Nano von BMG LABTECH GmbH aufgenommen und analysiert. Mit steigender Konzentration an 5-Keto-Gluconat in den Proben wurde nach Durchführung der Reaktion eine zunehmende Absorption bei 404 nm beobachtet, die bei Proben mit D-Gluconat und 2-Keto-D-Gluconat nicht sichtbar war (Abbildung 3-20 B). Außerdem zeigte sich eine gute Korrelation der Absorption bei 404 nm und der Konzentration an enthaltenem 5-Keto-D-Gluconat mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,99$  (Abbildung 3-21, links). Zusätzlich wurde der Test auch mit sterilem und bewachsenem Vollmedium mit Zusatz von Kanamycin und Thymidin und 0,1 M Glycerol als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Da Fructose eine starke Reaktion im Seliwanoff-Test



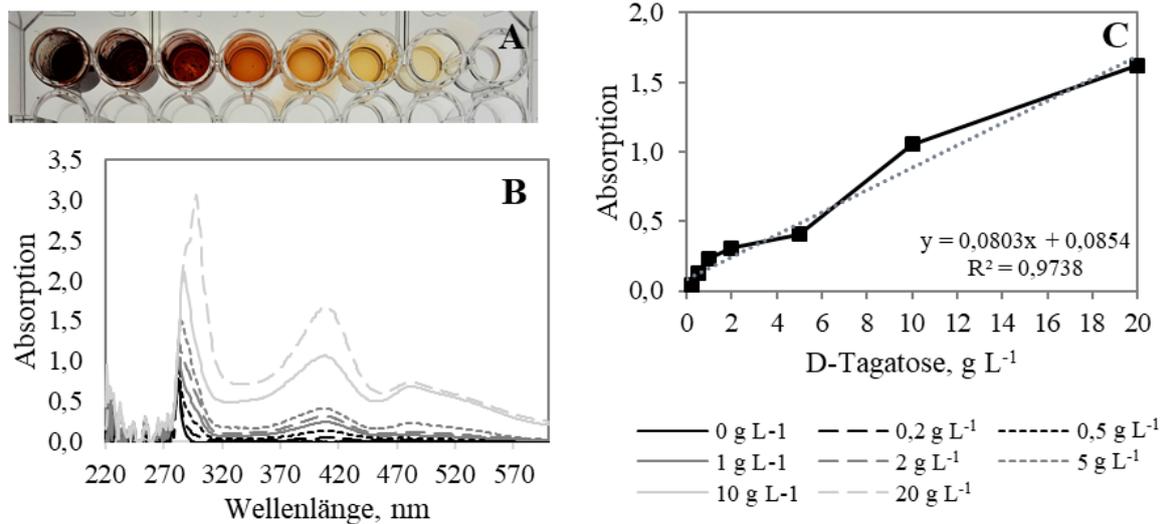
**Abbildung 3-20.** Ergebnisse des modifizierten Seliwanoff-Tests mit Reinsubstanzen von Gluconat, 2- und 5-Keto-D-Gluconat in unterschiedlichen Konzentrationen. A: Verfärbung von 5-Keto-D-Gluconat nach Seliwanoff-Test im Doppelansatz mit steigender Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat von unten nach oben ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $20 \text{ g L}^{-1}$ ) und Negativkontrolle in obersten Vertiefungen. B: Absorptionsspektren der Reinsubstanzen nach Seliwanoff-Test in steigenden Konzentrationen. Spektren wurden mit einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar® Nano von BMG LABTECH GmbH aufgenommen.



**Abbildung 3-21.** Eichgerade zur Quantifizierung von 5-Keto-D-Gluconat mit Seliwanoff-Test durch Absorption bei 404 nm (links) in unbewachsenem Medium und durch die Differenz der Absorptionen bei 404 nm und 480 nm in bewachsenem Medium (rechts). Angegeben sind neben der Ausgleichsgerade die zugehörigen Geradengleichungen und das jeweilige Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Als Medium wurde VM mit 0,1 M Glycerol verwendet.

zeigte, war diese als Kohlenstoffquelle ungeeignet. D-Glycerol sollte nicht mit Resorcin reagieren und wurde daher als Kohlenstoffquelle für die Anzucht von *Gluconobacter* getestet. Steriles Vollmedium mit Glycerol zeigte keine Reaktion im Seliwanoff-Test, jedoch wurden für den Überstand aus bewachsenem Medium zwei lokale Absorptionsmaxima bei 404 nm und 480 nm gemessen (nicht gezeigt). Um ein verzerrtes Messergebnis der 5-Keto-D-Gluconat Konzentration durch Bestandteile oder Metabolite der Mediums zu vermeiden, wurden zur Auswertung der Daten jeweils die Differenz der Absorption bei 404 nm und 480 nm berechnet (Abbildung 3-21, rechts). Die Korrelation zwischen Absorption und Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat wurde dadurch nicht negativ beeinflusst. Damit wurde bestätigt, dass sich der modifizierte Seliwanoff-Test in Kombination mit Zellanzucht und Biotransformationen in 96-Well Mikrotiterplatten als Hochdurchsatz-Methode zur Identifizierung von Stämmen mit einer hohen Produktion von 5-Keto-D-Gluconat eignete. Die Zellanzucht von Expressionsstämmen basierend auf *G. oxydans* 621H BP.9 erfolgte für folgende Versuche in Vollmedium mit 0,1 M Glycerol, Kanamycin und Thymidin. Während der Vorbereitung der ruhenden Zellen konnte mit diesem Anzuchtmedium der Waschschrift mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer entfallen. Für ein Screening der lehrstuhlinternen Stammsammlung wurde jedoch wegen der Anforderungen der Stämme an das Medium zur Anzucht der Zellen EPmod-Medium verwendet. Aufgrund der Bildung von D-Fructose während der Zellanzucht in EPmod durch Oxidation von D-Mannitol und dessen starker Reaktion im Seliwanoff-Test, welche während die Absorption des gebildeten 5-Keto-D-Gluconats maskiert hätte, wurde bei der Verwendung von EPmod als Nährmedium für die Zellanzucht ein Waschschrift mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer während der Vorbereitung der ruhenden Zellen vor der Biotransformation des D-Gluconats beibehalten.

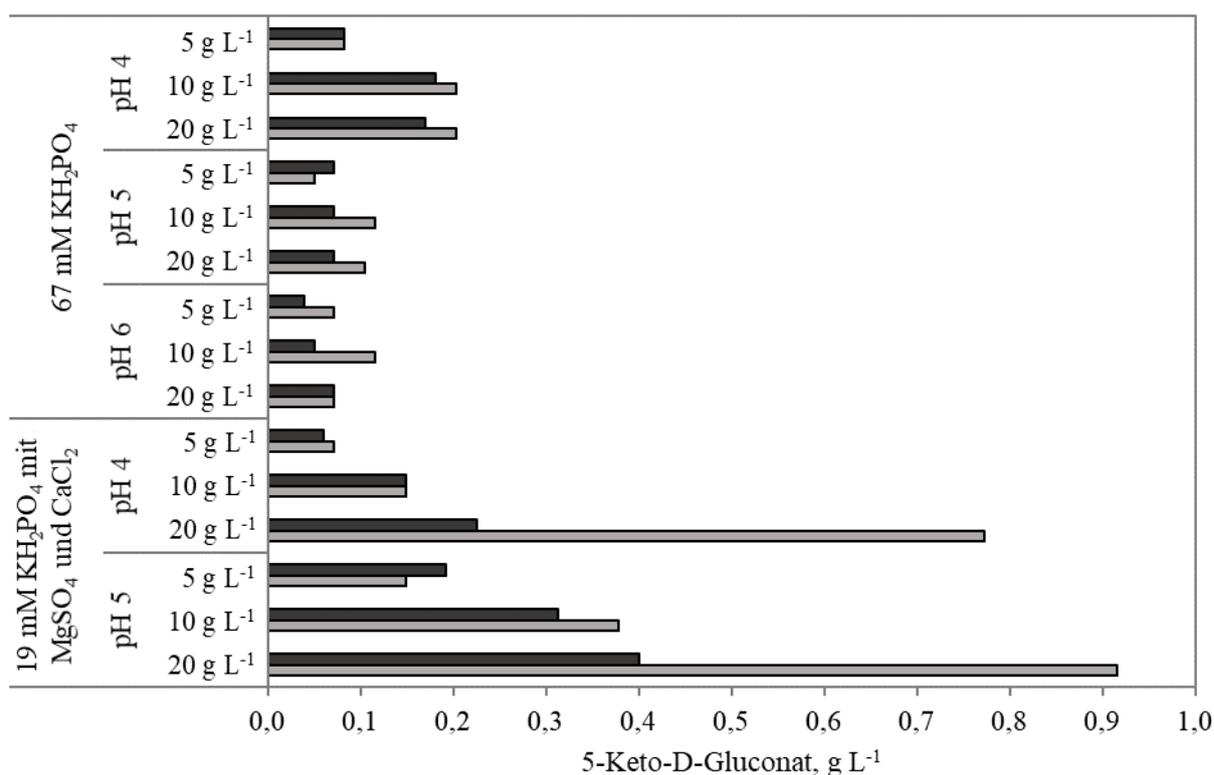
Neben dem Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat war auch die Anwendung des modifizierten Seliwanoff-Tests für die Quantifizierung anderer Ketohehexosen mit industrieller Relevanz wie D-Tagatose denkbar. Daher wurde der hier entwickelte modifizierte Seliwanoff-Test mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-Tagatose, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, in 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g L<sup>-1</sup>  $\text{CaCl}_2$  und 0,2 g L<sup>-1</sup>  $\text{MgSO}_4$  durchgeführt. D-Tagatose zeigte eine ähnlich starke Rotfärbung wie Fructose (Abbildung 3-22 A). Zur Auswertung der Absorptionsspektren wurden die einzelnen Proben daher 1:10 (v/v) in 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  verdünnt. Es zeigten sich wiederum zwei lokale Absorptionsmaxima bei 404 nm und 480 nm (Abbildung 3-22 B). Durch die Korrelation der Absorption bei 404 nm und der eingesetzten Konzentration an D-Tagatose konnte eine Eichgerade zur Quantifizierung von Tagatose erstellt werden (Abbildung 3-22 C). Dadurch zeigt sich, dass der modifizierte Seliwanoff-Test vielseitig für verschiedene Substanzen und Anwendungen einsetzbar ist.



**Abbildung 3-22.** Ergebnisse des modifizierten Seliwanoff-Tests mit D-Tagatose in unterschiedlichen Konzentrationen. A: Verfärbung von D-Tagatose nach Seliwanoff-Test. Konzentration an D-Tagatose von links nach rechts fallend. B: Absorptionsspektren mit 1:10 (v/v) verdünnten Proben nach Seliwanoff-Test mit D-Tagatose in steigenden Konzentrationen. C: Korrelation zwischen der Absorption bei 404 nm und D-Tagatose-Konzentration mit Angabe der zugehörigen Geradengleichung und des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  für die berechnete der Ausgleichsgerade. Zu Beginn eingesetzte Konzentrationen in 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g L<sup>-1</sup>  $\text{CaCl}_2$  und 0,2 g L<sup>-1</sup>  $\text{MgSO}_4$ : 0 g L<sup>-1</sup>, 0,2 g L<sup>-1</sup>, 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup>, 2 g L<sup>-1</sup>, 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup>. Spektren wurden mit einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar<sup>®</sup> Nano von BMG LABTECH GmbH aufgenommen.

### 3.6 Studien zur Optimierung der Gluconat-Oxidation durch Polyol Dehydrogenasen

In den vorherigen Experimenten in Kapitel 3.4.2 und 3.4.3 wurde ersichtlich, dass die Aktivität der Polyol Dehydrogenase gegenüber D-Gluconat den entscheidenden limitierenden Faktor in der Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat darstellte. Um die idealen Reaktionsbedingungen der Gluconat-Oxidation zu ermitteln, wurde die Aktivität der Polyol Dehydrogenase gegenüber D-Gluconat in *G. oxydans* 621H und dem Multideletionsstamm BP.8 in 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 4, 5 oder 6 und in 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit 0,1 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  und 0,2 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$  mit pH 4 oder 5 getestet. Der Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$  als Kofaktor der Polyol Dehydrogenase sollte deren Aktivität und damit die Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat verbessern (Schmid und Urlacher 2007; Saichana et al. 2015). Dazu wurden ruhende Zellen von *G. oxydans* 621H bzw. BP.8 gemäß Kapitel 2.3.7 vorbereitet und die Ansätze in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit 200  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 und verschiedenen Konzentrationen an D-Gluconat in den unterschiedlichen Puffern über 24 h bei 30 °C und 180 rpm



**Abbildung 3-23.** Ergebnisse aus Biotransformationen in 96-Well Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-Gluconat in verschiedenen Puffern zur Optimierung der Aktivität der Polyol Dehydrogenase gegenüber D-Gluconat. Die Bestimmung der 5-Keto-D-Gluconat Konzentration erfolgte durch den modifizierten Seliwanoff-Test. ■ *G. oxydans* 621H; ▒ BP.8. Die Absorptionen bei 404 nm und 480 nm wurden anhand von Spektren mit einem Absorptions-Microplate Reader SPECTROstar® Nano von BMG LABTECH GmbH aufgenommen.

inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch den modifizierten Seliwanoff-Test (Kapitel 2.4.2). Die Ergebnisse in Abbildung 3-23 bestätigten die Beobachtungen in Kapitel 3.4.2, da auch hier durch die Senkung des pH-Wertes von 5 bzw. 6 auf pH 4 in 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  für beide Stämme und fast allen eingesetzten Konzentrationen an D-Gluconat die Konzentration an produzierten 5-Keto-D-Gluconat um das 1,7- bis 2,5-Fache anstieg. Jedoch wurde Aktivität der Polyol Dehydrogenase bei Ansätzen mit 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  im Vergleich zu 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  noch weiter gesteigert. Die höchsten Konzentrationen an 5-Keto-D-Gluconat wurden hier mit BP.8 bei pH 5 erreicht und waren im Vergleich zu den Ergebnissen mit 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit pH 5 etwa 4,5-fach erhöht (Abbildung 3-23). Daher wurde ein Puffer mit 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5) mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgSO}_4$  für folgende Biotransformationen bevorzugt eingesetzt.

### **3.6.1 Mutagenese der Polyol Dehydrogenase SldAB\_621H zur Optimierung der Oxidation von D-Gluconat**

Um die Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat deutlich zu erhöhen, wurde im Folgenden die Variabilität der Substratspektren von Polyol Dehydrogenasen mit gerichteter Mutagenese untersucht und daraufhin die Aktivität der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H gegenüber D-Gluconat durch ungerichtete Mutagenese optimiert.

#### **3.6.1.1 Veränderung der Substratspezifität und des Substratspektrums durch gerichtete Mutagenese**

Die Substratspektren von sechs Polyol Dehydrogenasen wurden bereits in Ganzzell-DCPIP-Assays in Kapitel 3.2.1 charakterisiert und deutliche Unterschiede in ihren Aktivitäten und Substraten sichtbar. Um Bereiche in der Sequenz zu identifizieren, die für die Aktivität und die Substratauswahl in der katalytischen Untereinheit SldA der Polyol Dehydrogenasen verantwortlich sein könnten, wurden die Aminosäuresequenzen der sechs charakterisierten Polyol Dehydrogenasen verglichen (Kapitel 2.5.2). Die Proteinsequenzen der katalytischen Untereinheit SldA der Polyol-Dehydrogenasen zeigten in Alignments einen hohen Konservierungsgrad über weite Bereiche der Sequenzen vor allem innerhalb der *Gluconobacter*- und *Komagataeibacter*- Gruppen (Abbildung 6-2). Die einzige Ausnahme innerhalb der *Gluconobacter*-Gruppe bildete SIA2\_3504, die sowohl in ihrer Proteinsequenz als auch in ihrer Aktivität und ihrem Substratspektrum deutlich von den anderen *Gluconobacter*-Vertretern abwich (Kapitel 3.2.1). Die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H (SldAB\_621H) und die Polyol Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 (SldAB1\_3504) unterschieden sich in vorherigen Ganzzell-DCPIP Assays ebenfalls deutlich in ihrer Oxidationsstärke (Kapitel 3.2.1). Die Sequenzen der beiden Proteine der katalytischen Untereinheit SldA wiesen jedoch nur zwei Abweichungen auf: An

Position 49 besitzt SldA\_621H ein Glycin, SldA1\_3504 ein Alanin; an Position 179 unterschieden sich die Sequenzen durch ein Isoleucin bzw. ein Leucin. Die Sequenz der kleinen Untereinheit ist in beiden Enzymen identisch. Die geringeren Oxidationsaktivitäten der SldAB1 aus *G. oxydans* DSM 3504 gegenüber D-Galactitol, *meso*-Erythritol, D-Mannitol, Ribitol, D-Sorbitol, L-Erythrose und D-Gluconat mussten daher eine Folge der beiden abweichenden Aminosäuren an Position 45 und 179 in der Untereinheit SldA sein. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine ortsspezifische Mutagenese an diesen beiden Positionen in der Nukleotidsequenz der SldAB1\_3504 durchgeführt, um die Auswirkung einer sukzessiven Überführung der Aminosäuresequenz von SldAB\_3504 in die Sequenz der SldAB\_621H zu untersuchen.

Die ortsspezifische Mutagenese der SldAB1\_3504 erfolgte mithilfe von Primer-Paaren, die die gewünschte Änderung in der Aminosäuresequenz durch spezifische Veränderung der Nukleotidsequenz ermöglichten (Kapitel 2.2.6). Alle Expressionsstämme, die eine durch diese Methode mutierte Version der Polyol Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 exprimieren, sind in Tabelle 3-15 zusammengefasst.

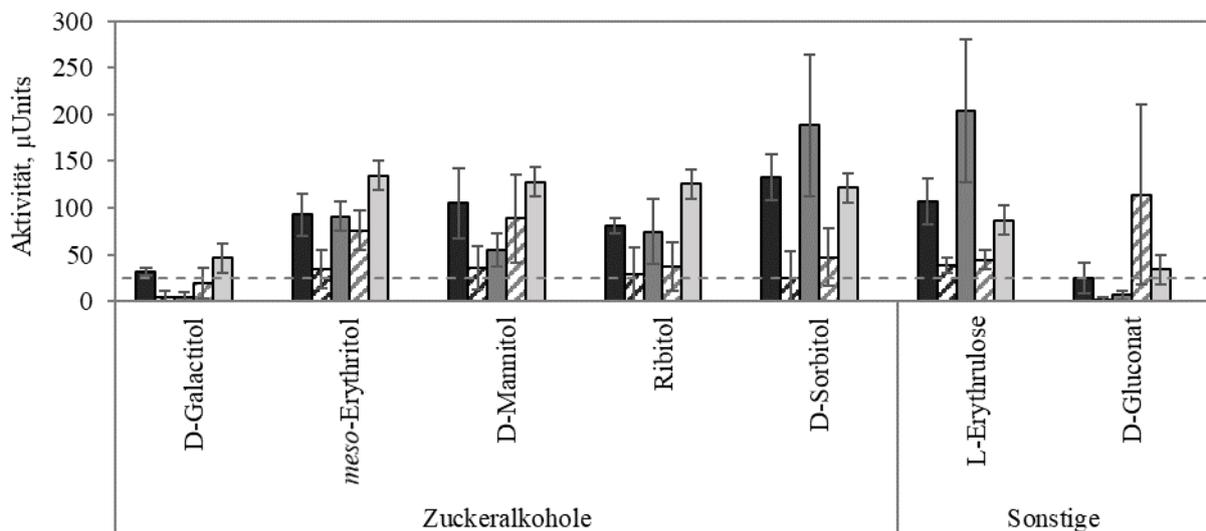
**Tabelle 3-15.** BP.9-Expressionsstämme, die eine mutierte Version der Polyol Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 exprimieren

Organismus / Stamm	Eigenschaften
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut1	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Ala45Gly
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut2	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Leu179Ile
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut1/2	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutationen Ala45Gly und Leu179Ile
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut3	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Leu179Val
BP.9 pADH-sldAB1_3504_Mut4	Expression der Polyol Dehydrogenase 1 (GLS_RS04720-5) aus <i>G. oxydans</i> DSM 3504 mit Mutation Leu179Gly

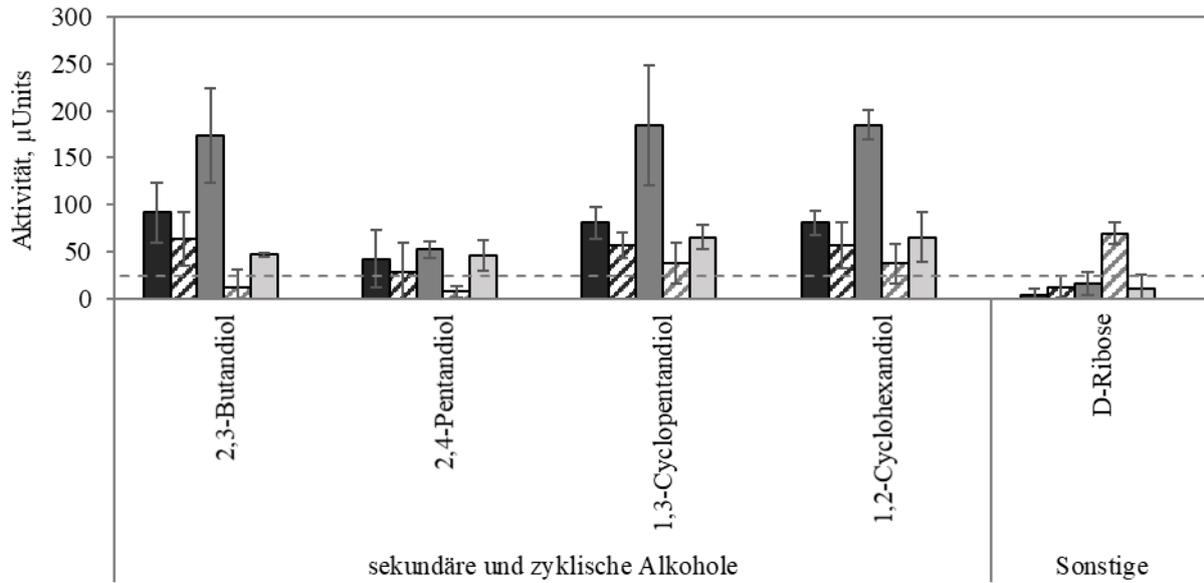
Die Sequenzen der Primer sldAB1\_3504-Mut1\_for / \_rev (Mutation 1) für den Austausch p.Ala45Gly und sldAB1\_3504-Mut2\_for / \_rev (Mutation 2) für den Austausch p.Leu179Ile finden sich in Tabelle 6-2. Die Einführung der Mutationen erfolgte mittels einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Kapitel 2.2.5.1). Dazu wurden der Primer sldAB1\_3504-Mut1\_for bzw. sldAB1\_3504-Mut2\_for mit sldAB1\_3504\_rev und der Primer sldAB1\_3504\_for mit sldAB1\_3504-Mut1\_rev bzw. sldAB1\_3504-Mut2\_rev kombiniert. Zur Expression der mutierten *sldAB*-Gene diente das Plasmid pMM3b, das durch eine präparative PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase und

den Primern pMM3buniV1\_for / \_rev amplifiziert wurde (Kapitel 2.2.5.1). Nach der Ligation der Fragmente (Kapitel 2.2.8) und Transformation in *E. coli* (Kapitel 2.3.3) folgte die triparentale Konjugation in den Multideletionsstamm BP.9 (Kapitel 2.3.5). Zusätzlich zu den Einzelmutationen wurde auch eine Doppelmutation (SldAB\_Mut1+2) erstellt. Dazu wurde das Plasmidfragment pADH-sldAB\_Mut2 in einer präparativen PCR mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase, den Primern pMM3buniV1\_for / \_rev und dem Plasmid pADH-sldAB\_Mut2 als Template amplifiziert. Die *sldAB\_Mut1*-Gene wurden mit den Primer-Paaren sldAB1\_3504-Mut1\_for und sldAB1\_3504\_rev bzw. sldAB1\_3504\_for und sldAB1\_3504-Mut1\_rev in einer präparativen PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase aus dem Plasmid pADH-sldAB\_Mut1 amplifiziert. Durch Ligation der Fragmente mit dem Vektorfragment von pADH\_sldAB\_Mut2\_V1, einer Transformation des Plasmids in *E. coli* (Kapitel 2.3.3) und der triparentale Konjugation in den Multideletionsstamm BP.9 entstand der Stamm BP.9 pADH-sldAB\_Mut1+2.

Zur Untersuchung der Auswirkung der Mutationen wurden die beiden Einzelmutanten BP.9 pADH-sldAB\_Mut1 und BP.9 pADH-sldAB\_Mut2, sowie die Doppelmutante BP.9 pADH-sldAB\_Mut1+2 in Ganzzell-DCPIP-Assays (Kapitel 2.4.1) untersucht und mit den Ergebnissen der Ganzzell-DCPIP-Assays der Expressionsstämme BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pADH-sldAB1\_3504 verglichen. Die Oxidationsaktivitäten der mutierten SldAB-Varianten für Substrate, gegenüber denen die SldAB\_621H in vorherigen Experimenten eine deutlich höhere Oxidationsaktivität gezeigt hatte als SldAB1\_3504



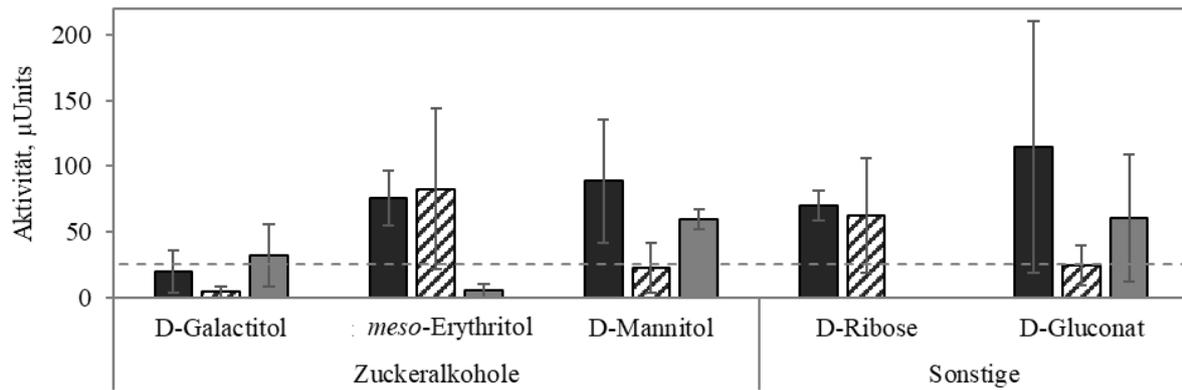
**Abbildung 3-24.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) von Polyol Dehydrogenasen nach gerichteter Mutagenese in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Substraten, für die SldAB1\_3504 in vorherigen Experimenten eine deutlich geringere Aktivität als SldAB\_621H gezeigt hatte. ■ BP.9 pMM4a-mSldAB, ▒ BP.9 pADH-sldAB1\_3504, ■ BP.9 pADH-sldAB\_Mut1, ▒ BP.9 pADH-sldAB\_Mut2, ▒ BP.9 pADH-sldAB\_Mut1+2. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von 25  $\mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 4-6 Replikate



**Abbildung 3-25.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) von Polyol Dehydrogenasen nach gerichteter Mutagenese in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Substraten, bei denen Einzelmutanten einen zusätzlichen Effekt gezeigt haben. ■ BP.9 pMM4a-mSldAB, ▨ BP.9 pADH-sldAB1\_3504, ■ BP.9 pADH-sldAB\_Mut1, □ BP.9 pADH-sldAB\_Mut2, □ BP.9 pADH-sldAB\_Mut1+2. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 4-6 Replikate

(Kapitel 3.2.1), sind in Abbildung 3-24 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Doppelmutante BP.9 pADH-sldAB\_Mut1+2 das Oxidationsvermögen von SldAB\_621H komplett nachbilden konnte. Jedoch reichte Mutation 1 (p.Ala45Gly) in SldAB1\_3504 aus, um die Aktivität der SldAB\_621H gegenüber Ribitol, D-Sorbitol und L-Erythrose zu erreichen. Die Oxidation von D-Gluconat wurde dagegen allein durch die Mutation p.Leu179Ile in BP.9 pADH-sldAB\_Mut2 ermöglicht. Um die Oxidationsaktivität von SldAB\_621H gegenüber *meso*-Erythritol zu erreichen, reichte eine der beiden Einzelmutationen aus. Für die Substrate D-Galactitol und D-Mannitol wurden beide Mutationen benötigt, um die Aktivität der SldAB1\_3504 auf die der SldAB\_621H zu erhöhen. Die einzelnen Mutationen hatten zusätzlichen Einfluss auf die Oxidation fünf weiterer Substrate (Abbildung 3-25). So beeinflusste Mutation 1 die Oxidation von 2,3-Butandiol, 1,3-Cyclopentandiol und 1,2-Cyclohexandiol positiv. Mutation 2 hatte einen negativen Effekt auf die Oxidation von 2,3-Butandiol und 2,4-Pentandiol, jedoch einen positiven Effekt auf die Oxidation von D-Ribose.

In einem nächsten Schritt wurden an der Position der Mutation 2 (p.Leu179Ile) weitere Aminosäure-Austausche vorgenommen, da gezeigt wurde, dass diese die Oxidation von D-Gluconat maßgeblich beeinflusste (Abbildung 3-24). Die Mutationen p.Leu179Val (Mutation 3) und p.Leu179Gly (Mutation 4) wurden durch die Primer-Paare sldAB1\_3504-Mut3\_for / \_rev und sldAB1\_3504-Mut4\_for / \_rev in die Nukleotidsequenz von *sldAB1\_3504* eingeführt. Die Klonierung der Einzelmutanten BP.9 pADH-sldAB\_Mut3 und BP.9 pADH-sldAB\_Mut4 erfolgte analog zu den



**Abbildung 3-26.** Oxidationsaktivität ( $\mu\text{Units}$ ) von Polyol Dehydrogenasen nach gerichteter Mutagenese an Position 179 in der katalytischen Untereinheit SldA1\_3504 in Ganzzell-DCPIP-Assays. ■ BP.9 pADH-sldAB\_Mut2, ▨ BP.9 pADH-sldAB\_Mut3, ■ BP.9 pADH-sldAB\_Mut4. Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 25 \text{ mM}$ ; 3-6 Replikate

vorherigen Stämmen aus der gerichteten Mutagenese. Zur Untersuchung der Auswirkungen weiterer Mutationen an der Position 179 in der SldA von SldAB1\_3504 dienten wiederum Ganzzell-DCPIP-Assays (Kapitel 2.4.1) mit den Stämmen BP.9 pADHsldAB\_Mut3 und BP.9 pADH-sldAB\_Mut4. Die Ergebnisse wurden mit denen für BP.9 pADH-sldAB\_Mut2 verglichen (Abbildung 3-26). Die Austausche von Leucin zu Valin (Mutation 3) und zu Glycin (Mutation 4) an Position 179 in der SldA1\_3504 konnten keine Verbesserung der Oxidationsaktivität gegenüber den getesteten Substraten herbeiführen. Mutation 3 führte sogar gegenüber D-Galactitol, D-Mannitol und D-Gluconat zu einer geringeren Oxidationsaktivität. Durch Mutation 4 verschwand dagegen die Fähigkeit, meso-Erythritol und D-Ribose zu oxidieren. Insgesamt wurde mit keiner der gezielt eingeführten Mutationen eine signifikante Verbesserung der Gluconat-Oxidation durch Polyol Dehydrogenasen erreicht.

### 3.6.1.2 Screening von zufällig mutagenisierten Polyol Dehydrogenasen

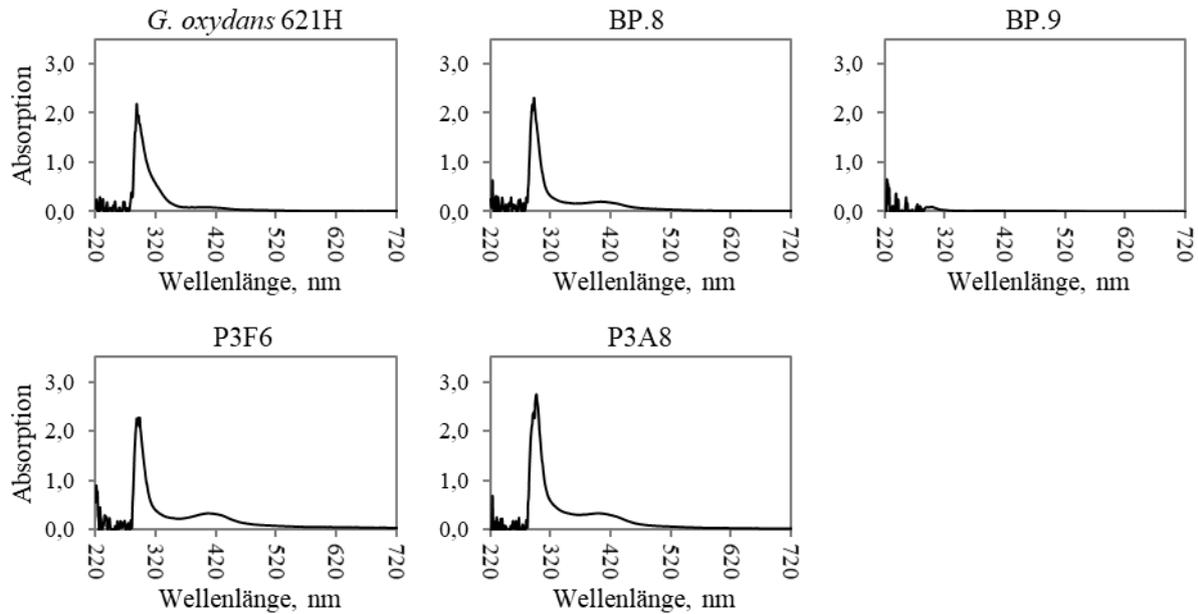
Durch die gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz einer Polyol Dehydrogenase mit gerichteter Mutagenese in Kapitel 3.6.1.1 wurde gezeigt, dass schon einzelne Veränderungen in der Aminosäuresequenz die oxidative Aktivität einer membranständigen Dehydrogenase gegenüber unterschiedlichen Substraten beträchtlich beeinflusst werden kann. Da jedoch keine Mutante aus der gerichteten Mutagenese eine signifikant höhere Aktivität gegenüber D-Gluconat aufwies, wurden im Folgenden Mutationen ungerichtet in die DNA-Sequenz der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H eingeführt. Gleichzeitig wurde ein Verfahren für Hochdurchsatz-Klonierungen und -Screenings der Enzym-Varianten etabliert. Als Mutagenese-Methode wurde die Error Prone PCR (nach Cadwell und Joyce 1992) ausgewählt, da hier durch Variation der Konzentrationen der einzelnen

Desoxyribonukleosid-Triphosphate und der Mangan-Konzentration im Ansatz die Häufigkeit mutierter DNA-Basen leicht verändert werden konnte. Dabei wurde die natürliche Fehlereinbaurrate der verwendeten Polymerase durch Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen an Oligonukleotiden und Mangan-Konzentrationen erhöht, um eine zufällige Mutagenese der Zielgene *sldAB\_621H* zu ermöglichen. Die Vorgehensweise wurde in Kapitel 2.2.6 erläutert. Durch die Variabilität der Konzentration an Mangan (0,1 mM oder 0,2 mM) im PCR-Ansatz in Verbindung mit den veränderten Oligonukleotid-Konzentrationen (ep-dNTPs) wurde die Mutageneserate in der DNA-Sequenz unterschiedlich beeinflusst. Durch Sequenzierung mehrerer *sldAB*-Varianten aus Error Prone PCR-Ansätzen konnte je nach gewählter Bedingung eine Mutationsrate zwischen 0,1 % und 0,6 % errechnet werden (Tabelle 3-16). Bei einer Annahme, dass keine stillen Mutationen vorlagen, entsprach diese Mutationsrate zwischen 3 und 16 veränderten Aminosäuren in der gesamten Sequenz der Polyol Dehydrogenase. Jedoch zeigte sich ein Ungleichgewicht der ausgetauschten Nukleotide. So wurde zu 58 % ein Thymin mit einem Adenosin (25 %), Guanin (8,3 %) oder Cytosin (25 %) substituiert. Ein Guanin wurde dagegen nur zu 8 % mutiert.

**Tabelle 3-16.** (Angenommene) Mutationsraten in der DNA- und Aminosäuresequenz nach Error Prone PCR mit unterschiedlichen Bedingungen.

Error Prone Ansatz	Mutationsrate in DNA	Angenommene Mutationsrate in Aminosäuresequenz
ep-dNTPs	0,15 %	0,45 %
ep-dNTPs + 0,1 mM MnCl <sub>2</sub>	0,1 %	0,3 %
ep-dNTPs + 0,2 mM MnCl <sub>2</sub>	0,6 %	1,8 %

Alle erfolgreich transformierten *E. coli*-Kolonien mit potenziell mutierten *sldAB*-Genen wurden in Chargen zusammengefasst und in Aliquots als Kryokulturen gesichert. Die triparentale Konjugation erfolgte nach der in Kapitel 2.3.5 beschriebenen Methode mit jeweils einem Aliquot einer Charge als Donor. Auf eine Vorkultur des Donorstammes wurde in diesem Fall verzichtet, die Variabilität der mutierten *sldAB*-Varianten in den transformierten *E. coli*-Zellen zu erhalten. Anschließend wurden je 200 µL EPmod-Medium mit einer Kolonie der Konjuganten in einer 96-Well Mikrotiterplatte angeimpft und für mindestens 48 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Als Kontrollen wurden *G. oxydans* 621H und BP.8 mitgeführt. Die Hauptkulturen wurden mit je 20 µL der Vorkultur in 180 µL Vollmedium mit 0,1 M Glycerol, Kanamycin und Thymin überimpft und nochmals 48 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Methode. Als Puffer wurde hier jedoch 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit pH 5 verwendet, um einen Vergleich der mutierten Varianten der Polyol Dehydrogenase mit dem Expressionsstamm BP.9 pMM4a-mSldAB mit den wildtypischen *sldAB*-Genen zu ermöglichen. BP.9 pMM4a-mSldAB produzierte in vorherigen



**Abbildung 3-27.** Absorptionsspektren verschiedener Kontroll-Stämme (*G. oxydans* 621H, BP.8 und BP.9) und der Stämme P3F6 und P3A8 mit potenziell mutierten Varianten der Polyol Dehydrogenase nach modifiziertem Seliwanoff-Test.

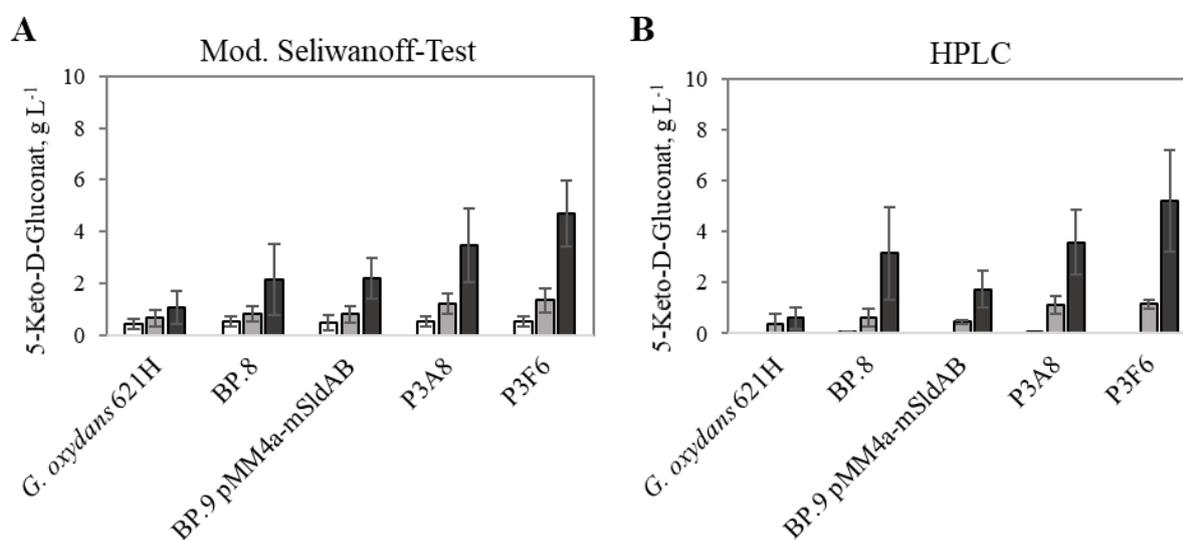
Experimenten mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat als Substrat innerhalb von 24 h etwa  $1 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat (Kapitel 3.4.2). Dieser Wert bezogen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 1 ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) diene daher als Referenz zur Identifikation von Stämmen mit mutierten SldAB-Varianten mit höheren Aktivitäten gegenüber D-Gluconat. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde vor Durchführung des modifizierten Seliwanoff-Tests zusätzlich die optische Dichte bei 600 nm bestimmt, um die erreichten Konzentrationen an 5-Keto-D-Gluconat auf eine vorgegebene Zelldichte zu normieren. Kulturen mit einer Zelldichte von  $\text{OD}_{600} > 0,3$  wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Die Absorptionsspektren nach Durchführung des modifizierten Seliwanoff-Tests mit verschiedenen Kontroll-Stämmen und Stämmen mit potentiell mutierten Varianten der Polyol Dehydrogenase sind in Abbildung 3-27 gezeigt. Die Menge an gebildeten 5-Keto-D-Gluconat wurde daraus anhand der in Abbildung 3-21 (rechts) gezeigten Eichgerade berechnet und auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 1 normiert. Durch das Screening wurden einige Stämme mit gesteigerter 5-Keto-D-Gluconat Produktion identifiziert, die in 24 h bis zu 3,5-fach mehr 5-Keto-D-Gluconat bildeten als BP.9 pMM4a-mSldAB (Tabelle 3-17).

Zur weiteren Analyse der identifizierten Stämme und zum Vergleich mit der wildtypischen SldAB in *G. oxydans* 621H, BP.8 und BP.9 pMM4a-mSldAB dienten Biotransformationen in Schüttelkolben mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat in  $19 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 5) mit  $0,1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  und  $0,2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , die über 24 h inkubiert wurden (Kapitel 2.3.8). Die Konzentrationen an gebildetem 5-Keto-D-Gluconat wurde durch den modifizierten Seliwanoff-Test und mittels HPLC-Analyse quantifiziert, um die Validität des modifizierten Seliwanoff-Tests nochmals zu bestätigen. Eine scheinbare Steigerung der Polyol

Dehydrogenase-Aktivität im Vergleich zu den Kontroll-Stämmen wurde für die Stämme P3A8 und P3F6 beobachtet (Abbildung 3-28). Jedoch war der Unterschied in der Gluconat-Oxidation mit P3A8 und P3F6 im Vergleich mit BP.8 und BP.9 pMM4a-mSldAB statistisch nicht signifikant. Auch durch eine Sequenzierung der *sldAB*-Gene in P3A8 und P3F6 konnte keine Mutation in der DNA-Sequenz gefunden werden.

**Tabelle 3-17.** Expressionsstämme mit mutierter SldAB-Variante und potenziell gesteigerter 5-Keto-D-Gluconat Produktion im Vergleich zu BP.9 pMM4a-mSldAB. Berechnung der 5- Keto-D-Gluconat Konzentration anhand des modifizierten Seliwanoff-Tests.

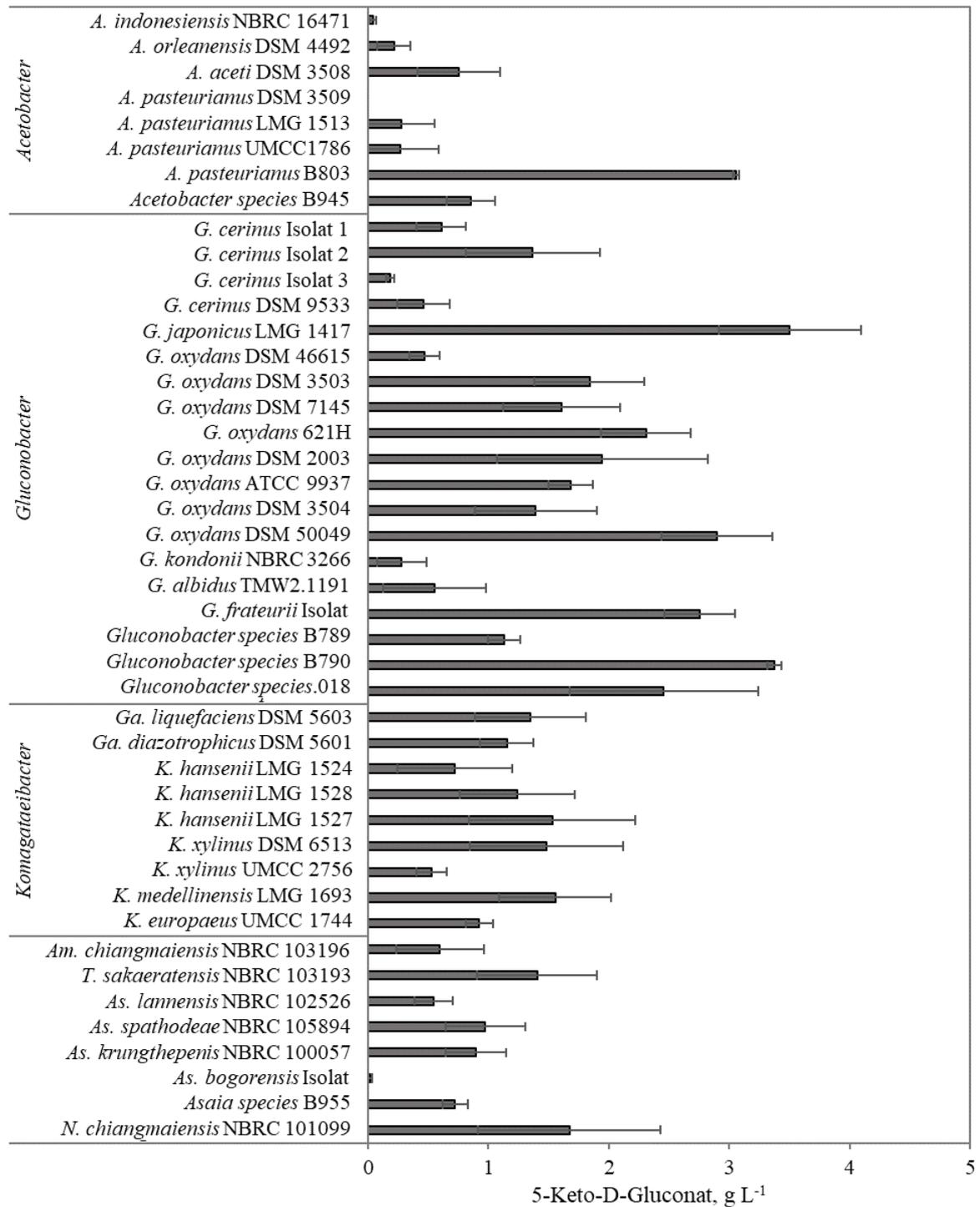
Stamm	OD <sub>600</sub>	A <sub>404 nm</sub> – A <sub>480 nm</sub>	5KG/OD <sub>600</sub> [g L <sup>-1</sup> ]
P3F6	0,54	0,22	4,63
P3A8	0,42	0,24	6,47
P7F2	0,77	0,39	6,87
P7E8	0,39	0,15	6,15
P7D9	0,52	0,24	6,78
P8D1	0,38	0,22	9,20
P8G11	0,34	0,13	6,45



**Abbildung 3-28.** Ergebnisse der modifizierten Seliwanoff-Tests und HPLC Analysen nach Biotransformationen mit mutierten SldAB-Varianten und Kontroll-Stämmen. A: Konzentrationen an 5-Keto-D-Gluconat nach modifiziertem Seliwanoff-Test. B: Konzentrationen an 5-Keto-D-Gluconat nach HPLC-Analyse. Biotransformationen wurden mit 20 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat in 19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 5) mit CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> über 24 h mit ruhenden Zellen verschiedener Kontroll-Stämme und der Stämme P3F6 und P3A8 mit potenziell mutierten Varianten der Polyol Dehydrogenase. □ 0 h; ■ 6 h; ■ 24 h. *c*<sub>Gluconat</sub> = 20 g L<sup>-1</sup>; OD<sub>600</sub> = 0,4; 3 – 4 Replikate.

### 3.6.2 Screening der Stammsammlung auf 5-Ketogluconat-Produktion durch den modifizierten Seliwanoff-Test

Durch Screening-Methoden wie dem Ganzzell-DCPIP-Assay war eine Identifizierung von Polyol Dehydrogenasen mit hohen Aktivitäten gegenüber D-Gluconat in Wildtypstämmen bisher nicht möglich, da nicht zwischen der Bildung von 2-Keto-Gluconat durch die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase und der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat durch die Polyol Dehydrogenase unterschieden werden konnte. Der modifizierte Seliwanoff-Test ist jedoch nicht sensitiv gegenüber vorhandenem 2-Keto-Gluconat, womit ein selektives Screening der 5-Keto-D-Gluconat Produktion in Wildtypstämmen realisiert werden konnte. Die in Tabelle 2-2 aufgelisteten Stämme wurden in technischen Triplikaten in 96-Well Mikrotiterplatten in EPmod-Medium als Vor- und Hauptkulturen kultiviert, die Zellen in 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5) gewaschen und über 24 h in 19 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgSO}_4$  mit 20 g  $\text{L}^{-1}$  D-Gluconat bei 30 °C und 180 rpm inkubiert (Kapitel 3.5). Anschließend wurde der modifizierte Seliwanoff-Test, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Als Nullwertabgleich wurden die Absorptionsspektren der Überstände der Zellsuspensionen vor der Inkubation bei 98 °C verwendet. Um eine Vergleichbarkeit des Screenings mit vorherigen Ausbeuten aus Biotransformationen mit kontrollierter Zelldichte zu gewährleisten, wurde die optische Dichte der gewachsenen Kulturen bei 600 nm bestimmt und für die Analyse auf einen Wert von 0,4 normiert. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 3-29 zusammengefasst. Die Einteilung der Stämme erfolgte nach den in Kapitel 3.1 bestimmten Verwandtschaftsgraden und festgelegten Gruppen. Die *Gluconobacter*-Gruppe erreichte im Mittel eine Ausbeute an 5-Keto-D-Gluconat von 20 %, die Komagataeibacter-Gruppe etwa 15%, die Asaia-Gruppe 11% und die Acetobacter-Gruppe 8 %. *G. oxydans* 621H, in dem die Polyol Dehydrogenase mit der bisher höchsten Aktivität gegenüber D-Gluconat nativ exprimiert wurde, produzierte innerhalb von 24 h 2,3 g  $\text{L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-29). Bei Verwendung von Vollmedium mit Fructose als Kohlenstoffquelle zur Anzucht der Zellen produzierte *G. oxydans* 621H nur etwa 1 g  $\text{L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-28). Dadurch wurde auch der Einfluss des Mediums zur Zellanzucht auf die 5-Keto-D-Gluconat-Produktion sichtbar. Die höchsten Konzentrationen an 5-Keto-D-Gluconat wurden mit den Stämmen *G. japonicus* LMG 1417 (3,5 g  $\text{L}^{-1}$ ), *Gluconobacter species* B790 (3,4 g  $\text{L}^{-1}$ ), *G. oxydans* DSM 50049 (2,9 g  $\text{L}^{-1}$ ) und *A. pasteurianus* B803 (3,1 g  $\text{L}^{-1}$ ) erreicht. Da *G. oxydans* 621H in der gleichen Zeit nur 2,3 g  $\text{L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat bildete ist bei einer Expression der Polyol Dehydrogenase aus *G. japonicus* LMG 1417 (AD937\_RS13350-5) im Multideletionsstamm BP.9 im Vergleich zu BP.9 pMM4a-mSldAB eine Steigerung der 5-Keto-D-Gluconat-Ausbeute von etwa 50 % denkbar. Vor allem *G. japonicus* LMG 1417 wäre hierzu ein geeigneter Kandidat, da für diese bereits eine Genomsequenzierung vorliegt und so eine Identifizierung und Charakterisierung der Polyol Dehydrogenase möglich ist.



**Abbildung 3-29.** Ergebnisse des Stammsammlung-Screenings mit dem modifizierten Seliwanoff-Test für die Produktion von 5-Keto-Gluconat. Biotransformationen wurden mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat in  $19 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 5) mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgSO}_4$  über 24 h mit ruhenden Zellen verschiedener Stämme aus der lehrstuhl internen Stammsammlung in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Konzentrationen an ge 5-Keto-D-Gluconat wurden mit modifiziertem Seliwanoff-Test bestimmt.  $c_{\text{Gluconat}} = 20 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{OD}_{600}$  normiert auf einen Wert von 0,4; 3 – 4 Replikate.

## 3.7 Oxidation von Antibiotika

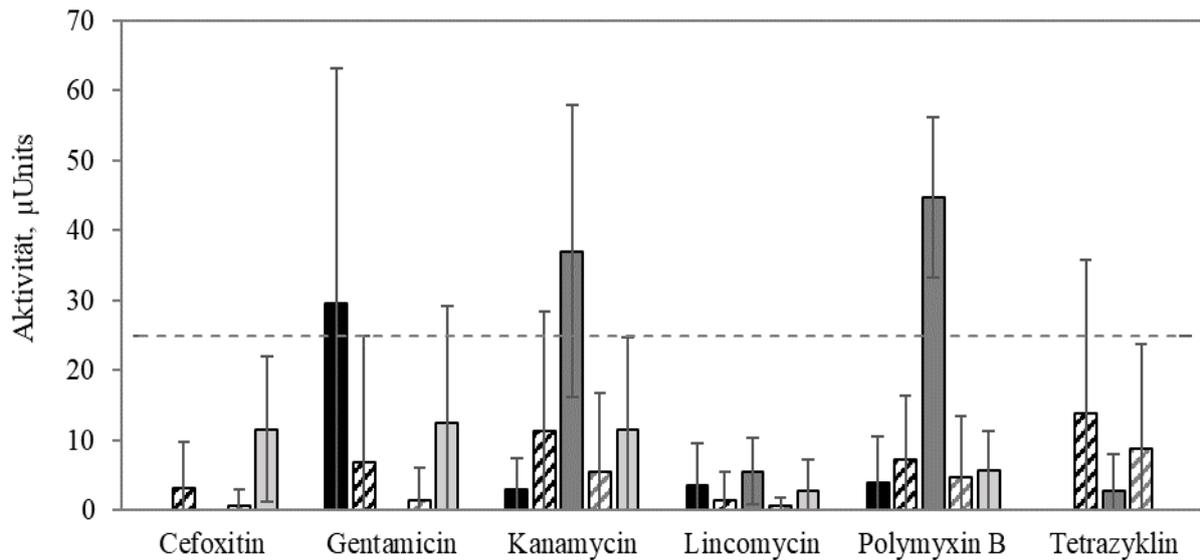
### 3.7.1 Charakterisierung der Oxidation von Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien

Die Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen verschiedener Essigsäurebakterien gegenüber Antibiotika wurde durch ein Screening in der lehrstuhlinternen Stammsammlung (Tabelle 2-2) untersucht. Dazu wurden sechs Antibiotika aus unterschiedlichen Gruppen und mit unterschiedlichen Wirkmechanismen ausgewählt: Cefoxitin aus der Gruppe der Cephalosporine wirkt aufgrund der Inhibition der Zellwandsynthese bakterizid. Essigsäurebakterien besitzen gegen dieses Antibiotikum eine natürliche Resistenz. Das Lincosamid-Antibiotikum Lincomycin, die beiden Aminoglykoside Gentamycin und Kanamycin, sowie Tetrazyklin, hemmen die Proteinbiosynthese, jedoch besitzt Tetrazyklin im Gegensatz zu den anderen genannten Wirkstoffen nur eine bakteriostatische Wirkung. Polymyxin B als Peptidantibiotikum schädigt dagegen die Zellmembran, wodurch bakterielle Zellen abgetötet werden. Eine mögliche oxidative Aktivität membranständiger Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien gegenüber den genannten Antibiotika wurde in Ganzzell-DCPIP Assays (Kapitel 2.4.1) mit verschiedenen Stämmen der lehrstuhlinternen Sammlung analysiert. Als Substratkonzentration wurden je 10 mM als Endkonzentration eingesetzt. Nur für Kanamycin wurde aufgrund des stark basischen Charakters des Moleküls und der pH-Abhängigkeit des Assays die Konzentration auf 2,5 mM herabgesetzt. Die Ergebnisse des Screenings wurden in Tabelle 3-18 zusammengefasst. Da die Schwankungen innerhalb der Reproduktionen teilweise hoch ausfielen, wurden die jeweils besten Stämme mit dem höchsten Oxidationspotenzial gegenüber einem getesteten Antibiotikum anhand deren minimalen Aktivität (Differenz zwischen Mittelwert und Standardabweichung) ausgewählt. Die höchste minimale Aktivität gegenüber Cefoxitin zeigte *K. xylinus* UMCC 2756 (111  $\mu$ Units), der auch gegenüber Gentamicin, Kanamycin und Lincomycin hohe Aktivitäten aufwies. Trotz der sehr ähnlichen Molekülstruktur von Gentamicin und Kanamycin unterschieden sich die Aktivitäten gegenüber beiden Substanzen in den getesteten Stämmen teilweise beträchtlich. Mit Gentamicin zeigten *G. oxydans* ATCC9937 und *Ga. diazotrophicus* DSM 5601 die höchsten minimalen oxidativen Aktivitäten (jeweils etwa 120  $\mu$ Units). Mit Kanamycin als Substrat erreichten dagegen *G. albidus* TMW2.1191 (89  $\mu$ Units) und mit Lincomycin *Gluconobacter speziei*.018 (108  $\mu$ Units) die höchsten minimalen Aktivitäten. *A. pasteurianus* LMG 1513 oxidierte Polymyxin B mit einer minimalen Aktivität von 218  $\mu$ Units. Bei der *Asaia*-Gruppe wurde bei keinem Vertreter eine oxidative Aktivität oberhalb des Schwellenwertes von 25  $\mu$ Units für die getesteten Antibiotika festgestellt. Auch für Tetrazyklin wurde nur für wenige Stämme eine oxidative Aktivität gemessen. *G. oxydans* DSM 50049 und *K. hansenii* LMG 1527 zeigten hier zwar eine Aktivität bis zu 71  $\mu$ Units, allerdings konnte aufgrund der Standardabweichungen eine tatsächliche oxidative Aktivität gegenüber Tetrazyklin ebenfalls nicht bestätigt werden (Tabelle 3-18).

**Tabelle 3-18.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener Acetobacteraceae Spezies in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Antibiotika

	Cefoxitin	Genta- micin	Kana- mycin	Linco- mycin	Poly- myxin B	Tetra- zyklin	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. indonesiensis</i> NBRC 16471	23±35	24±31	7±13	39±28	24±38	0±0
	<i>A. orleanensis</i> DSM 4492	24±42	42±39	47±14	34±36	18±14	0±0
	<i>A. acetii</i> DSM 3508	52±16	113±97	48±48	31±28	23±20	3±5
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1513	10±21	0±0	0±0	12±27	298±80	0±0
	<i>A. pasteurianus</i> UMCC1733	26±31	42±46	82±27	72±24	165±27	0±0
	<i>A. pasteurianus</i> UMCC1786	9±18	11±15	6±13	10±19	1±1	0±0
	<i>A. pasteurianus</i> B803	25±49	32±55	29±50	89±32	51±60	0±0
	<i>Acetobacter species</i> B945	7±12	2±4	0±0	3±3	20±34	0±0
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. cerinus</i> Isolat 1	81±119	7±13	0±0	108±37	66±70	15±13
	<i>G. cerinus</i> Isolat 2	20±8	85±48	22±26	15±26	21±13	10±17
	<i>G. cerinus</i> DSM 9533	12±11	4±7	12±14	12±20	8±14	4±7
	<i>G. japonicus</i> LMG 1417	73±36	51±40	41±65	69±70	66±56	9±18
	<i>G. oxydans</i> DSM 46615	132±113	16±25	9±18	118±35	112±99	17±28
	<i>G. oxydans</i> DSM 3503	72±60	115±55	127±63	98±47	68±59	4±10
	<i>G. oxydans</i> DSM 7145	3±7	25±36	22±32	15±25	1±2	0±0
	<i>G. oxydans</i> 621H	0±0	21±30	14±31	21±30	17±35	0±0
	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	21±37	18±26	27±25	88±42	26±35	3±4
	<i>G. oxydans</i> ATCC 9937	65±15	179±55	39±42	84±73	30±27	2±4
	<i>G. oxydans</i> DSM 3504	53±15	23±40	49±76	30±35	9±15	0±0
	<i>G. oxydans</i> DSM 50049	117±55	61±53	48±68	92±73	99±67	53±77
	<i>G. kondonii</i> NBRC 3266	25±14	21±21	0±0	1±2	3±3	0±0
	<i>G. albidus</i> TMW2.1191	11±15	152±99	93±4	22±45	127±69	0±0
	<i>G. frateurii</i> Isolat	30±60	21±27	7±12	34±41	31±36	12±28
	<i>Gluconobacter spesies</i> .018	169±118	33±64	49±65	212±104	166±51	0±0
	<i>Gluconobacter spesies</i> B789	112±100	137±60	101±58	123±70	94±83	14±25
	<i>Gluconobacter spesies</i> B790	87±48	115±54	113±37	91±33	62±35	22±32
<i>Komagataeibacter</i>	<i>Ga. liquefaciens</i> DSM 5603	129±121	24±38	39±60	50±40	126±31	12±28
	<i>Ga. diazotrophicus</i> DSM 5601	23±33	231±111	44±60	38±53	161±55	0±0
	<i>K. hansenii</i> LMG 1524	0±0	72±107	76±21	80±57	111±81	4±10
	<i>K. hansenii</i> LMG 1528	8±8	17±5	0±0	5±9	9±11	2±4
	<i>K. hansenii</i> LMG 1527	95±29	57±19	195±141	130±50	128±114	71±72
	<i>K. xylinus</i> DSM 6513	24±33	54±5	125±65	65±44	31±13	0±0
	<i>K. xylinus</i> UMCC 2756	238±127	192±132	124±54	119±23	72±17	0±0
	<i>K. medellinensis</i> LMG 1693	22±38	60±59	113±58	39±17	103±8	0±0
	<i>K. europaeus</i> UMCC 1744	20±22	84±20	66±35	35±27	26±33	0±0
	<i>Am. chiangmaiensis</i> NBRC 103196	42±72	34±18	80±33	39±40	0±0	1±3
<i>T. sakaeratensis</i> NBRC 103193	20±34	2±3	0±0	12±18	2±3	2±4	
<i>Asaia</i>	<i>As. lannensis</i> NBRC 102526	0±0	0±0	4±6	17±29	0±0	0±0
	<i>As. spathodeae</i> NBRC 105894	4±7	4±10	0±0	5±10	2±3	0±0
	<i>As. krungthepensis</i> NBRC 100057	15±22	17±29	0±0	3±5	0±0	0±0
	<i>As. bogorensis</i>	17±34	24±21	4±8	4±3	22±21	10±22
	<i>Asaia spesies</i> B955	14±18	14±19	2±3	17±12	9±13	0±0

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units



**Abbildung 3-30.** Oxidative Aktivität ( $\mu\text{Units}$ ) von membranständigen Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 gegenüber verschiedenen Antibiotika in Ganzzell-DCPIP-Assays. Expression der Dehydrogenase-Gene erfolgte in Multideletionsstamm BP.9. ■ BP.9 pADH-mSDH\_Gal; ▨ BP.9 pADH-mGDH\_Gal; ■ BP.9 pADH-mFuDH\_Gal; ■ BP.9 pADH-sldAB\_Gal; ▨ BP.9 pADH-ADH\_Gal; Gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von  $25 \mu\text{Units}$ .  $OD_{600} = 0,4$ ;  $c_{\text{Substrat}} = 10 \text{ mM}$  (Kanamycin:  $c = 2,5 \text{ mM}$ ); 3-5 Replikate

Um membranständige Dehydrogenasen zu identifizieren, die für die Oxidation der Antibiotika verantwortlich sind, wurden die in Kapitel 3.2.3 bereits charakterisierten Enzyme aus *G. albidus* TMW2.1191 genauer untersucht. Der Wildtypstamm *G. albidus* TMW2.1191 oxidierte Gentamicin, Kanamycin und Polymyxin B (Tabelle 3-18). Zur Zuordnung der Aktivitäten zu einzelnen membranständigen Dehydrogenasen wurden Ganzzell-DCPIP-Assays mit allen BP.9-Stämmen durchgeführt, die eine membranständige Dehydrogenase aus *G. albidus* TMW2.1191 exprimierten (Abbildung 3-30). Hier wurden, ähnlich wie bei den Ergebnissen für den Wildtypstamm *G. albidus* TMW2.1191, nur für Gentamicin, Kanamycin und Polymyxin B im Mittel Aktivitäten über dem festgesetzten Schwellenwert gemessen. Jedoch lagen die Aktivitäten der einzelnen membranständigen Dehydrogenasen deutlich unter denen des Wildtyps *G. albidus* TMW2.1191. Für Gentamicin zeigte die membranständige Sorbitol Dehydrogenase (BP.9 pADH-mSDH\_Gal) eine durchschnittliche oxidative Aktivität von  $30 \mu\text{Units}$ , allerdings ergab sich auch hier wieder eine hohe Diskrepanz zwischen den einzelnen Messungen, was in der hohen Standardabweichung deutlich wurde (Abbildung 3-30). Mit dem Stamm BP.9 pADH-mFuDH\_Gal, in dem eine membranständige Fucose Dehydrogenase exprimiert wurde, wurde dagegen gegenüber Kanamycin und Polymyxin B eine mittlere oxidative Aktivität von  $37 \mu\text{Units}$  bzw.  $45 \mu\text{Units}$  nachgewiesen.

### 3.7.2 Auswirkungen der Oxidation auf die antibiotische Wirksamkeit gegenüber *E. coli* und *S. aureus*

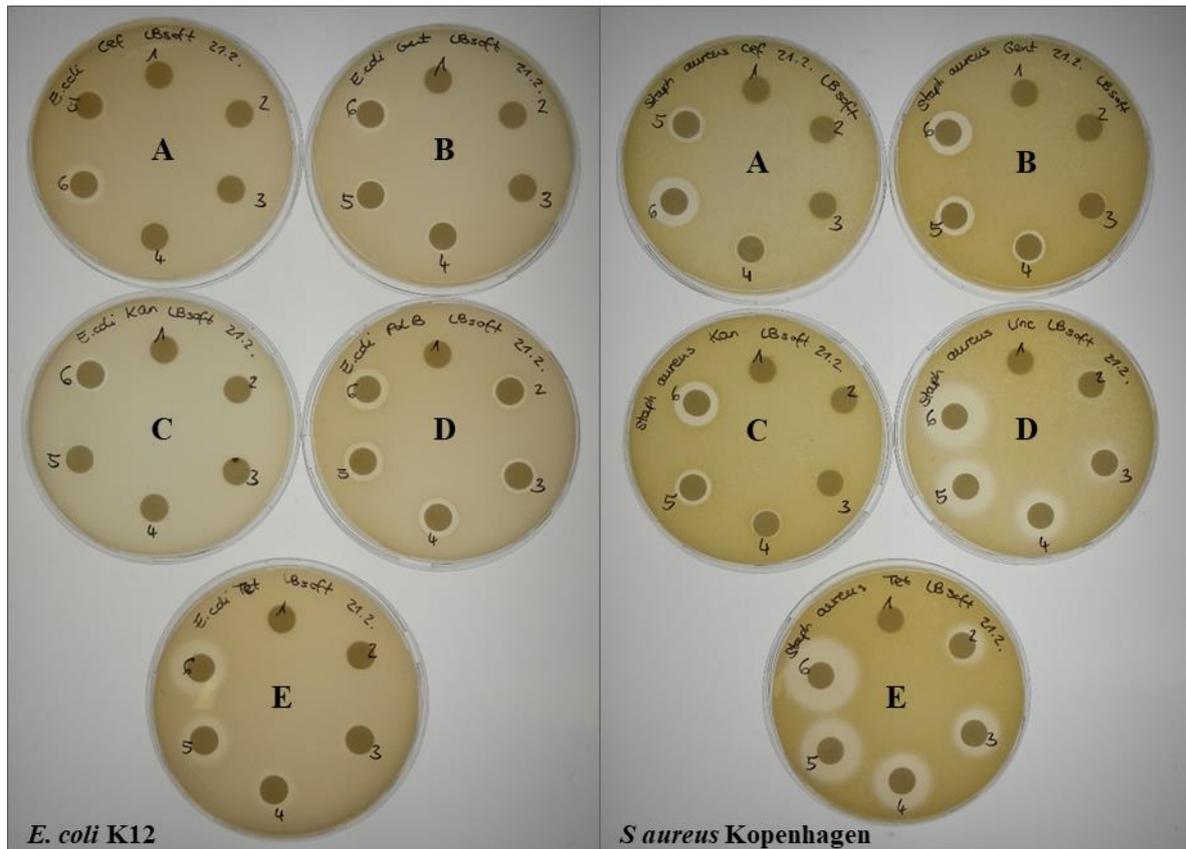
Im zweiten Schritt wurde geprüft, ob die Oxidation der Antibiotika einen Einfluss auf deren antibiotische Wirksamkeit hat. Dazu wurden zunächst Wachstumsversuche zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) (Kapitel 2.4.5.1) und Plattendiffusionstests mit den zuvor getesteten Antibiotika für *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 durchgeführt (Kapitel 2.4.5.2). Da Lincomycin bei Gram-negativen bzw. Polymyxin B bei Gram-positiven Bakterien keine oder nur eine sehr geringe Wirkung zeigen, wurden diese für den jeweiligen Stamm in den Tests vernachlässigt. Die MHK wurde durch das Wachstum von *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 in LB Medium in steigenden Antibiotika-Konzentrationen ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in 96-Well Mikrotiterplatten im Doppelansatz ermittelt (Tabelle 3-19).

**Tabelle 3-19.** Minimale Hemmkonzentrationen von *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 gegenüber verschiedenen Antibiotika in LB-Medium

	<i>E. coli</i> K12	<i>S. aureus</i> DSM 20232
Cefoxitin	5 $\mu\text{g / mL}$	5 $\mu\text{g / mL}$
Gentamicin	10 $\mu\text{g / mL}$	10 $\mu\text{g / mL}$
Kanamycin	25 $\mu\text{g / mL}$	50 $\mu\text{g / mL}$
Lincomycin	-	5 $\mu\text{g / mL}$
Polymyxin B	1 $\mu\text{g / mL}$	-
Tetracyclin	5 $\mu\text{g / mL}$	1 $\mu\text{g / mL}$

Für Plattendiffusionstests (Kapitel 2.4.5.2) wurden Overlay-Agarplatten verwendet, bei denen der Keimschicht-Agar mit dem jeweiligen Bakterium beimpft und sterile Filterplättchen mit 20  $\mu\text{L}$  an unterschiedlich konzentrierten Antibiotika-Lösungen ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) aufgelegt wurden. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und anschließend die Wirksamkeit eines Antibiotikums anhand des Hemmhof-Durchmessers beurteilt (Abbildung 3-31). Die Wirksamkeit der jeweiligen Antibiotika unterschied sich zwischen *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232. Die Durchmesser der Hemmhöfe waren für alle eingesetzten Konzentrationen messbar.

Zur Überprüfung, ob eine Oxidation der Antibiotika durch die membranständigen Dehydrogenasen die MHK oder die Ergebnisse der Plattendiffusionstests beeinflusste, wurden Biotransformationen mit ausgewählten Stämmen der Stammsammlung an Essigsäurebakterien durchgeführt. Die Zellanzucht der Essigsäurebakterien erfolgte in EPmod-Medium. Die Auswahl der Stämme erfolgte anhand der ersten Ergebnisse der Ganzzell-DCPIP-Assays (Kapitel 3.7.1) und ist in Tabelle 3-20 zusammengefasst.



**Abbildung 3-31.** Plattendiffusionstest für unterschiedliche Antibiotika mit *E. coli* K12 (links) und *S. aureus* DSM 20232 (rechts). A: Cefoxitin; B: Gentamicin; C: Kanamycin; D: Polymyxin B (links) bzw. Lincomycin (rechts); E: Tetrazyklin. Die Beurteilung der Wirksamkeit eines Antibiotikums erfolgte anhand des Hemmhof-Durchmessers. Eingesetzte Antibiotika-Konzentrationen: 1:  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 2:  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 3:  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4:  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 5:  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 6:  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$

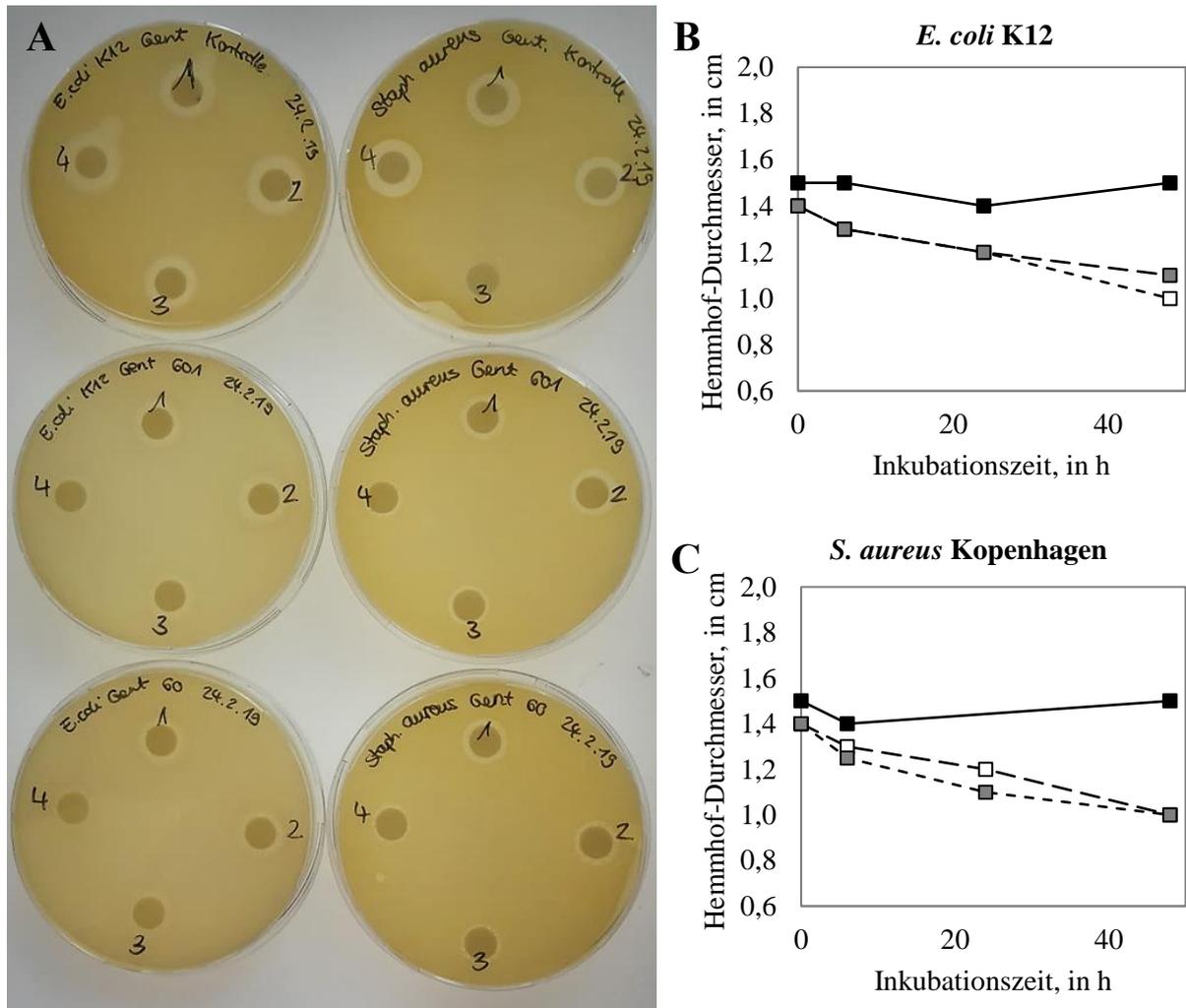
**Tabelle 3-20.** Kombinationen an Antibiotika und Essigsäurebakterienstämmen in Biotransformationen

Antibiotikum	Teststämmen in Biotransformationen
Cefoxitin	<i>Gluconobacter spesies.018</i> <i>K. hansenii</i> LMG 1527
Gentamicin	<i>G. oxydans</i> ATCC 9937 <i>K. hansenii</i> LMG 1527
Kanamycin	<i>G. albidus</i> TMW2.1191 <i>K. hansenii</i> LMG 1527
Lincomycin	<i>G. oxydans</i> DSM2003 <i>K. hansenii</i> LMG 1527
Polymyxin B	<i>A. pasteurianus</i> LMG1513 <i>Gluconobacter spesies.018</i>
Tetrazyklin	<i>G. oxydans</i> DSM50049 <i>K. hansenii</i> LMG 1527

Für jedes Antibiotikum wurde außerdem eine Kontrolle mitgeführt, bei der nur das jeweilige Antibiotikum in Puffer inkubiert wurde. Dadurch wurde eine Verringerung der Wirksamkeit aufgrund des Abbaus eines Antibiotikums während der Versuchsdauer ausgeschlossen. Die Biotransformationen wurden mit einer Konzentration von je  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  des jeweiligen wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben durchgeführt und die Ansätze über 48 h bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 180 rpm in Schikanekolben inkubiert. Zu Beginn des Versuchs, sowie nach 6 h, 24 h und 48 h Inkubation wurde eine Probe von je 1 mL entnommen.

Für Wachstumsversuche in 96-Well Mikrotiterplatten zur erneuten Bestimmung der MHK wurde jeweils der Überstand der nach 48 h entnommenen Proben aus den Biotransformationen verwendet. Die Proben aus den Biotransformationen wurden schließlich auf eine Konzentration verdünnt, die der zuvor ermittelten minimalen Hemmkonzentration entsprach. Zusätzlich wurden Verdünnungen eingesetzt, bei denen die anfänglich eingesetzte Antibiotika-Konzentration dem 0,2-, 0,5-, 1,5- und 2-Fachen der zuvor bestimmten MHK entsprachen. Zur Berechnung der Verdünnung wurde die anfänglich in den Biotransformationen eingesetzte Antibiotika-Konzentration vorausgesetzt. Als Kontrollen wurden zusätzlich das Zellwachstum ohne Antibiotikum und mit auf die MHK eingestelltem Antibiotikum mitgemessen. Jedoch wurde in keinem der getesteten Ansätze ein Unterschied in der MHK mit Antibiotika-Proben aus Biotransformationen mit Essigsäurebakterien festgestellt.

Für erneute Plattendiffusionstests wurde der jeweilige Überstand der aus den Biotransformationen entnommenen Proben auf eine Antibiotika-Konzentration von  $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  eingestellt. Zur Berechnung der Verdünnung wurde auch hier mit der anfangs eingesetzten Antibiotika-Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  gerechnet. Auf die Filterplättchen wurden anschließend je  $20 \text{ } \mu\text{L}$  der verdünnten Proben mit unterschiedlicher Inkubationsdauer pipettiert und die Platten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei fast allen Platten zeigte sich kein Unterschied in der Wirksamkeit der Antibiotika, was durch den gleichbleibenden Durchmesser des Hemmhofes bei allen Proben sichtbar wurde. Nur Gentamicin zeigte eine scheinbare Abnahme seiner Wirksamkeit im Lauf der durchgeführten Biotransformationen mit *G. oxydans* ATCC 9937 und *K. hansenii* LMG 1527. Bei jeweils beiden Ansätzen mit *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 nahm der Durchmesser des Hemmhofes in Abhängigkeit der Dauer der Inkubation des Gentamicins mit *G. oxydans* ATCC 9937 oder *K. hansenii* LMG 1527 in der Biotransformation innerhalb von 48 h kontinuierlich ab (Abbildung 3-32 A). Insgesamt war eine Verkleinerung des Hemmhofes zwischen 20 % und 30 % nach einer Inkubation des Antibiotikums über 48 h mit den Essigsäurebakterien zu verzeichnen (Abbildung 3-32 B und C). Mit den eingesetzten Kontrollansätzen aus den Biotransformationen wiesen beide Overlay-Platten mit *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 dagegen einen gleichbleibenden Hemmhof-Durchmesser auf (Abbildung 3-32).



**Abbildung 3-32.** Plattendiffusionstest mit Gentamicin und *E. coli* K12 bzw. *S. aureus* DSM 20232 nach Oxidation mit Essigsäurebakterien in Biotransformationen. A: Bewachsene Overlay-Platten mit *E. coli* K12 (links) und *S. aureus* DSM 20232 (rechts). Hemmhöfe durch Proben aus Biotransformationen nach 0 h (1), 6 h (2), 24 h (3) und 48 h (4). oben: Kontrolle ohne Zellen; Mitte: Biotransformation mit *K. hansenii* LMG 1527; unten: Biotransformation mit *G. oxydans* ATCC 9937. B und C: Ausbildung des Hemmhof-Durchmessers bei Wachstum mit *E. coli* K12 (B) und *S. aureus* DSM 20232 (C) in Abhängigkeit der Inkubationsdauer von Gentamicin mit Essigsäurebakterien in Biotransformationen. —■— Kontrolle; -■- *G. oxydans* ATCC 9937; -□- *K. hansenii* LMG 1527

## 4 Diskussion

Essigsäurebakterien sind bekannt für unvollständige Oxidationen, durch die wichtige biotechnologische Verfahren entwickelt wurden. Verantwortlich dafür sind membranständige Dehydrogenasen, die verschiedenste Kohlenhydrate unter Erhalt des Kohlenstoffgerüsts zu den korrespondierenden Produkten wie Aldehyde, Ketone oder organische Säuren umsetzen, welche anschließend in das umgebende Medium abgegeben werden (Mamlouk und Gullo 2013; Deppenmeier et al. 2002). Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Ganzzellkatalysatoren basierend auf diesen unvollständigen Oxidationen. Der Fokus lag dabei auf der Katalyse der Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose durch Polyol Dehydrogenasen und der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose durch membranständige Glucose und Polyol Dehydrogenasen über das Zwischenprodukt D-Gluconat. Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass durch Deletion einzelner membranständiger Dehydrogenasen die Oxidationsaktivität anderer membranständiger Dehydrogenasen deutlich gesteigert werden kann (Soemphol et al. 2008). Für die Entwicklung von hoch effizienten Ganzzellkatalysatoren auf Basis der Oxidationen von membranständigen Dehydrogenasen war Ausgangspunkt der Arbeit der Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 (Peters 2013). In *G. oxydans* 621H BP.9 wurden zuvor bereits neun membranständige Dehydrogenasen deletiert, was eine Expression und Charakterisierung einzelner membranständiger Dehydrogenasen ermöglichte und die Effizienz der Ganzzellkatalyse erheblich steigern sollte.

### 4.1 Screening der Aktivitäten der lehrstuhlinterne Stammsammlung in Ganzzell-DCPIP-Assays

Zu Beginn der Arbeit wurde die interne Stammsammlung an Essigsäurebakterien des Lehrstuhls für Mikrobiologie (TUM) in Ganzzell-DCPIP-Assays auf membranständige Dehydrogenasen mit potenziell hohen Oxidationspotenzialen hin überprüft. Wie erwartet unterschieden sich die einzelnen Stämme teilweise sehr stark in ihren Aktivitätsmustern – sowohl zwischen als auch innerhalb der festgelegten Gruppen – und zeigten damit die Variabilität der Aktivitäten von membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien (Tabelle 3-1). Die Aktivitäten der vier Gruppen, in die die getesteten Stämme eingeteilt wurden, zeigten bei allen Substraten, dass *Acetobacter* im Mittel die geringsten Oxidationspotenziale aufwies. *Acetobacter* wächst vor allem in alkoholreichen Umgebungen und so ist auch sein Stoffwechsel an das Wachstum in dieser Umgebung angepasst (Ehrenreich und Liebl 2017). Die schnelle Oxidation von Zuckern und Zuckeralkoholen war vermutlich in der Entwicklung der *Acetobacter*-Stämme nicht vorrangig und der Erwerb von membranständigen Dehydrogenasen, die Zucker(alkohole) schnell umsetzen, nicht nötig. Die ermittelten meist niedrigen Aktivitäten von *Acetobacter* spiegeln diese Anpassung an alkoholreiche Habitate wider. Die Genera *Komagataeibacter* und *Gluconacetobacter*, die mit *Am. chiangmaiensis* NBRC 103196 und *T. sakaeratensis*

NBRC 103193 in der *Komagataeibacter*-Gruppe zusammengefasst wurden, wurden vor allem aus Blüten und Zuckerrohr isoliert und werden wie *Acetobacter* in der Produktion von Essig eingesetzt (Kerstens et al. 2006). Entsprechend ihrer vielseitigen Lebensräume wiesen die Stämme der *Komagataeibacter*-Gruppe variable Ergebnisse in den Ganzzell-DCPIP-Assays auf und unterschieden sich teilweise stark von Stamm zu Stamm (Tabelle 3-1). Die Genera *Asaia* und *Gluconobacter* wachsen dagegen bevorzugt in zuckerreichen Umgebungen (Kerstens et al. 2006). Während ein Großteil der getesteten *Gluconobacter*-Stämme die eingesetzten Zucker und Zuckeralkohole entsprechend ihres Lebensraums schnell oxidierten, wurden bei Stämmen der Gattung *Asaia* jedoch eher niedrige Oxidationspotenziale ermittelt (Tabelle 3-1). *Asaia* Stämme wurden vor allem aus tropischen Blütenpflanzen isoliert und tolerieren hohe Konzentrationen an Zuckern wie D-Glucose (Kerstens et al. 2006; Mamlouk und Gullo 2013). Die Oxidation von Zuckern im Periplasma, Transporter in der Cytoplasmamembran und der zentrale Stoffwechsel wurden in *Asaia* jedoch bislang nicht genauer untersucht.

Die höchste im Assay gemessene Aktivität von 934  $\mu$ Units wurde mit *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 bei der Oxidation von D-Gluconat gemessen. Da auch die Aktivität gegenüber D-Glucose in diesem Stamm sehr hoch war, könnten dessen membranständige Glucose und Polyol Dehydrogenase effektive Enzyme für eine Ganzzell-Katalyse zur Herstellung von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose sein. Allerdings wird D-Gluconat in Essigsäurebakterien von der Gluconat-2-Dehydrogenase zu 2-Keto-D-Gluconat oder von der Polyol Dehydrogenase zu 5-Keto-D-Gluconat oxidiert. Ob die Aktivität von *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 gegenüber D-Gluconat auf eine Gluconat-2-Dehydrogenase, eine Polyol Dehydrogenase oder auf beide Enzyme zurückzuführen war und in welchem Verhältnis die Aktivitäten der Enzyme zueinander standen, konnte in diesem Versuch nicht geklärt werden. Bei einem späteren Screening der Stammsammlung zur Bestimmung der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat zeigte sich, dass eine bzw. mehrere Gluconat-2-Dehydrogenasen oder eine unbekannte membranständige Dehydrogenase maßgeblich für die hohe Aktivität gegenüber D-Gluconat sein musste, da durch *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 nicht übermäßig mehr 5-Keto-D-Gluconat produziert wurde als in anderen getesteten Essigsäurebakterien (Kapitel 3.6.2). Im Genom von *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 findet sich nur eine membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase mit drei Untereinheiten, die in einem BLASTP gegen das Genom von *G. oxydans* 621H zu dessen Gluconat-2-Dehydrogenase eine Identität von 60 – 80 % aufweist. Um nachzuweisen, dass diese Dehydrogenase allein für die hohe Aktivität von *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 gegenüber D-Gluconat verantwortlich war, sind jedoch weitere Versuche erforderlich.

## 4.2 Charakterisierung membranständiger Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien im Multideletionsstamm BP.9

### 4.2.1 Substratspektren von Polyol Dehydrogenasen

Polyol Dehydrogenasen katalysieren bedeutende industrielle Oxidationen zur Produktion von Dihydroxyaceton, L-Erythrose und 5-Keto-D-Gluconat (Claret et al. 1994; Moonmangmee et al. 2002; Matsushita et al. 2003). Bisher wurden jedoch größtenteils nur Substratspektren von Polyol Dehydrogenasen aus *Gluconobacter* Spezies beschrieben und dafür meist aus Membranfraktionen isolierte Dehydrogenasen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden sechs membranständige Polyol Dehydrogenasen aus fünf verschiedenen Essigsäurebakterien der Gattungen *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* und *Komagataeibacter* im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 exprimiert und die Substratspektren der Enzyme in Ganzzell-DCPIP-Assays charakterisiert. Alle getesteten Polyol Dehydrogenasen oxidierten sekundäre und zyklische Alkohole, die als typische Substrate von Polyol Dehydrogenasen gelten. D-Arabitol war dabei das einzige Substrat, dass von allen untersuchten Polyol Dehydrogenasen umgesetzt wurde (Abbildung 3-3). Von 43 getesteten Substraten betrug die Anzahl der oxidierten Substrate pro Polyol Dehydrogenase zwischen 6 und 19 Substraten. Die Polyol Dehydrogenase aus *K. hansenii* LMG 1524 besaß das kleinste Spektrum mit 6 Substraten. Peters et al. (2017) beschrieben eine Polyol Dehydrogenase aus *K. rhaeticus*, die wie auch die in dieser Arbeit untersuchten Polyol Dehydrogenasen in BP.9 exprimiert und anschließend charakterisiert wurde. Sie oxidierte ebenfalls nur 3 Substrate von insgesamt 43 Substraten, wobei auch Aktivität gegenüber D-Arabitol gezeigt wurde.

Die Substratspektren der Polyol Dehydrogenasen aus *G. suboxydans* IFO 3257, *G. industrius* IFO 3260, *G. suboxydans* IFO 3255 und *Gluconobacter* sp. 33 wurden durch Isolierung der Enzyme aus solubilisierten Membranfraktionen und Durchführung von enzymatischen Assays basierend auf DCPIP mit den isolierten Enzymen bestimmt (Ameyama et al. 1985; Adachi et al. 2001; Sugisawa und Hoshino 2002; Lapenaite et al. 2005). Die Untersuchungen zeigten ausschließlich die Oxidation von sekundären bzw. zyklischen Alkoholen und Zuckeralkoholen, jedoch wurden in diesen Studien deutlich weniger Substrate getestet. Zusätzlich ist durch die Isolation der membranständigen Dehydrogenasen von der Cytoplasmamembran eine Beeinflussung der enzymatischen Aktivität – beispielsweise durch eine teilweise falsche Faltung durch die veränderten Umgebungsbedingungen – nicht auszuschließen. Die Expression der Enzyme im Multideletionsstamm BP.9, der auch schon bei Mientus et al. (2017) für die Bestimmung der Substratspektren der membranständigen Dehydrogenasen aus *G. oxydans* 621H verwendet wurde, und der Ganzzell-DCPIP Assay bieten hier den Vorteil das gesamte Substratspektrum einer membranständigen Dehydrogenase in einer Umgebung bestimmen zu können, die den nativen Bedingungen sehr ähnlich ist. Wie auch bei den in dieser Studie untersuchten Polyol Dehydrogenasen wurde D-Arabitol von allen bereits charakterisierten Polyol Dehydrogenasen oxidiert und könnte daher als allgemeines Merkmal für die Einordnung von membranständigen Dehydrogenasen zu den Polyol

Dehydrogenasen verwendet werden. Die in dieser Arbeit untersuchte Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H wurde bereits von Mientus et al. (2017) durch Expression im Multideletionsstamm BP.9 charakterisiert, wobei die Oxidation von 25 Substraten beschrieben wurde. Anders als in der Studie von Mientus et al. wurde in der vorliegenden Arbeit eine schwache Oxidation von *myo*-Inositol und Cellobiose mit 44  $\mu$ Units und 37  $\mu$ Units ermittelt und Galactitol als neues Substrat identifiziert (Abbildung 3-2 bis Abbildung 3-4). Jedoch lagen die ermittelten minimalen Aktivitäten der SldAB\_621H gegenüber diesen Substraten mit 36  $\mu$ Units (*myo*-Inositol) und 28  $\mu$ Units (Galactitol) nur knapp über bzw. mit 19  $\mu$ Units (Cellobiose) etwas unter dem Schwellenwert von 25  $\mu$ Units. Die SldAB1\_3504 besaß ein ähnliches Substratspektrum wie die SldAB\_621H, allerdings erreichte diese deutlich geringere Aktivitäten. Interessant hierbei ist, dass sich beide Sequenzen in ihren Aminosäuresequenzen in der katalytischen Untereinheit (SldA) nur in zwei Aminosäuren unterscheiden (Abbildung 6-2). Die kleinen Untereinheiten (SldB) sind in beiden Enzymen identisch. Die Auswirkungen des Austausches dieser Aminosäuren untereinander und Überführung in andere Aminosäuren wurde in Kapitel 3.6.1.1 geschildert und in Kapitel 4.6.1 genauer diskutiert.

Besonders das Substratspektrum der Polyol Dehydrogenase 2 aus *G. oxydans* DSM 3504 unterschied sich deutlich von bisher bekannten Polyol Dehydrogenasen und auch den anderen in dieser Arbeit charakterisierten SldAB-Enzymen (Abbildung 3-2 bis Abbildung 3-4). Die SldAB2\_3504 oxidierte nur fünf der getesteten 26 Substrate der Alkohole und Zuckeralkohole, jedoch fünf von neun getesteten Aldosen und zwei der drei Disaccharide. Die Oxidation von Aldosen wurde eher membranständigen Glucose Dehydrogenasen zugeschrieben (Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017; Sará-Páez et al. 2015) und konnte auch in dieser Arbeit belegt werden (Abbildung 3-2). Somit besitzt die SldAB2\_3504 ein Substratspektrum, das sich zwischen dem von membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen bewegt und typische Substrate beider Enzyme vereint. Die meisten Substrate der untersuchten Polyol Dehydrogenasen fanden sich bei den Alkoholen und Zuckeralkoholen und besaßen meist eine Kettenlänge von bis zu sechs Kohlenstoffatomen. Aldosen und Ketosen wurden durch die hier charakterisierten Polyol Dehydrogenasen nur vereinzelt oxidiert. Auch in anderen Studien wurde die Oxidation von Aldosen wie D-Erythrose, D-Ribose und D-Threose durch die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H beschrieben (Peters et al. 2013; Mientus et al. 2017) und auch die Umsetzung einiger Aldopentosen gezeigt (Yakushi et al. 2018), jedoch wurde die Oxidation von D-Glucose und Disacchariden bisher nur membranständigen Glucose Dehydrogenasen zugeordnet (Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017; Sará-Páez et al. 2015). Durch die Charakterisierung der SldAB2\_3504 und SldAB\_med wurde auch erstmals die Oxidation von Aldoheptosen, Aldoheptosen und Ketoheptosen belegt. Die Polyol Dehydrogenase SldAB2\_3504 oxidierte in Ganzzell-DCPIP-Assays D-Glucose, D-Mannose und D-Glucoheptose (Abbildung 3-4). SldAB\_med setzte Glucoheptose und Sedoheptulose um (Abbildung 3-4). Auch die Oxidation von Disacchariden wurde bisher nur für membranständige Alkohol und Glucose Dehydrogenasen beschrieben (Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017; Sará-Páez et al. 2015). Maltose und Saccharose wurden durch die SldAB2\_3504 oxidiert und eine mögliche

Umsetzung von Cellobiose wurde mit den Polyol Dehydrogenasen aus *G. oxydans* 621H und *G. albidus* TMW2.1191 gezeigt (Abbildung 3-4). Die ermittelten Aktivitäten lagen hier jedoch weit unter den Aktivitäten der untersuchten membranständigen Glucose Dehydrogenasen.

#### 4.2.2 Substratspektren von membranständigen Glucose Dehydrogenasen

In dieser Arbeit wurden erstmals die Substratspektren von sieben membranständigen Glucose Dehydrogenasen aus sechs Essigsäurebakterien verglichen. Die membranständigen Glucose Dehydrogenasen oxidierten in den Ganzzell-DCPIP-Assays zwischen 3 und 11 Substrate der insgesamt 14 Substrate aus der Gruppe der Aldosen, Ketosen und Disacchariden (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). Das Substratspektrum der mGDH\_621H wurde bereits beschrieben und konnte in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden (Peters et al. 2013; Mientus et al. 2017). Auch das Substratspektrum der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus *Ga. diazotrophicus* DSM 5601 wurde zuvor von Sará-Paez et al. (2015) untersucht. Sará-Paez et al. konnten in ihrer Arbeit die Oxidation von D-Glucose, D-Galactose und D-Xylose durch die mGDH\_PA15 ebenfalls belegen. Die in dieser Arbeit gegenüber Mannose und Saccharose ermittelten Aktivitäten von 400  $\mu$ Units und 70  $\mu$ Units wurden bei Sará-Paez et al. nicht gemessen, sondern nur sehr geringe relative Aktivitäten (bezogen auf die Aktivität gegenüber Glucose). Für die relativen Aktivitäten gegenüber den Zuckeralkoholen Mannitol und Sorbitol gaben Sará-Paez et al. ähnliche Werte an wie für Mannose und Saccharose. Da membranständige Glucose Dehydrogenasen keine Zuckeralkohole oxidieren (Ameyama et al. 1981a; Mientus et al. 2017; Peters et al. 2017), kann hier von einer unspezifischen Hintergrundaktivität oder Überresten von Aktivitäten anderer membranständiger Dehydrogenasen ausgegangen werden. Während der Isolation der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus der Cytoplasmamembran wurden diese unter Umständen nicht vollständig abgetrennt und bedingen damit die geringe messbare Aktivität gegenüber den Zuckeralkoholen. Die ebenfalls geringe Aktivität gegenüber Mannose und Saccharose wäre somit auch einer unspezifischen Hintergrundaktivität oder der Aktivität anderer membranständiger Dehydrogenasen zuzuordnen. Die fehlenden Aktivitäten der mGDH\_PA15 bei Sará-Paez et al. kann möglicherweise durch die Isolierung des Enzyms aus der Membran und der Aktivitätsmessung in einer nicht nativen Umgebung verursacht worden sein. Die Expression und die Charakterisierung der mGDH\_PA15 im Multideletionsstamm BP.9 ermöglicht dagegen die Bestimmung der Substrate und Aktivitäten des Enzyms in einer Umgebung, die der nativen Umgebung sehr nahe kommt und bildet dadurch vermutlich auch die nativen Oxidationspotenziale des Enzyms besser ab.

Das kleinste Spektrum mit nur 3 Substraten besaß die mGDH2\_3504, die keine D-Glucose oxidierte, sondern nur D-Ribose, D-Xylose und D-Glucoheptose (Abbildung 3-5). Sie erfüllt daher nicht das klassische Kriterium einer membranständigen Glucose Dehydrogenase, die vor allem durch die Oxidation von D-Glucose charakterisiert wurde. Jedoch unterscheidet sich die mGDH2\_3504 auch ihrer

Aminosäuresequenz deutlich von den übrigen hier getesteten membranständigen Glucose Dehydrogenasen (Abbildung 6-3) und sollte daher beispielsweise eher als membranständige Ribose Dehydrogenase (mRDH) bezeichnet werden. Die verbliebenen membranständigen Glucose Dehydrogenasen unterschieden sich in nur wenigen Substraten, jedoch variierte die Aktivität der Enzyme gegenüber den Substraten teilweise sehr stark. Bei Aldosen als Substrate wurden bei den Enzymen mGDH\_Gal, mGDH1\_3504, mGDH\_hans und mGDH\_PAI5 durchschnittlich eine zweifach höhere Aktivität gezeigt als bei den Enzymen mGDH\_621H und mGDH\_med. Für Disaccharide zeigten die Enzyme mGDH\_Gal, mGDH1\_3504 und mGDH\_hans einen solchen Aktivitätsunterschied zu den Enzymen mGDH\_621H, mGDH\_med und mGDH\_PAI5. D-Glucose wurde von mGDH\_Gal und mGDH1\_3504 mit 60 – 90 % mehr Aktivität oxidiert als von der mGDH\_621H. In der vorangegangenen Charakterisierung der lehrstuhlinternen Stammsammlung wurden mit *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM 3504 etwa gleich hohe Aktivitäten gegenüber D-Glucose gemessen und auch die Aktivität von *G. albidus* TMW2.1191 lag nur 14 % über der von *G. oxydans* 621H. Dies zeigte, dass auch der zelluläre Hintergrund wie die Transkriptions- und Translationsmaschinerie, die Verfügbarkeit von Kofaktoren wie PQQ oder die Effizienz der Atmungskette eine wichtige Rolle in der Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen in Wildtypstämmen spielen könnten. Auch deshalb war ein direkter Vergleich von Aktivitäten membranständiger Dehydrogenasen in Wildtypstämmen schwierig. Vor allem könnte aber die Deletion anderer membranständiger Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9 der entscheidende Faktor für die Steigerung der Aktivität der Expressionsstämme gegenüber D-Glucose gewesen sein. Da der verfügbare Platz in der Cytoplasmamembran oft limitiert ist (Guigas und Weiss 2016), führt die Deletion anderer membranständiger Dehydrogenasen gegebenenfalls zu einer erhöhten Anzahl der gewünschten Dehydrogenase in der Cytoplasmamembran und damit zu einer schnelleren Oxidation der D-Glucose. Erstaunlich war auch, dass die Aminosäuresequenzen der membranständigen Glucose aus *G. oxydans* 621H und *G. oxydans* DSM 3054 zu 99,5% identisch sind und sich nur in 4 Aminosäuren unterscheiden (Abbildung 6-3), die mGDH1\_3504 jedoch für alle Substrate, die von beiden Enzymen oxidiert werden, höhere Aktivitäten aufwies (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). In einer Studie von Cleton-Jansen et al. (1991) wurde ebenfalls deutlich, dass schon ein Austausch eines Histidins an Position 787 mit einem Asparagin durch eine spontane Punktmutation in der Nukleotidsequenz das Substratspektrum einer membranständigen Glucose Dehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans* deutlich verändern kann und die Oxidation von Maltose ermöglichte.

#### **4.2.3 Membranständige Dehydrogenasen in *G. albidus* TMW2.1191**

Im Genom von *G. albidus* TMW2.1191 wurden acht membranständige Dehydrogenasen durch bioinformatische Anwendungen identifiziert (Kapitel 2.5.1), die Gluconat-2-Dehydrogenase und Lactat Dehydrogenase wurden jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die membranständige Alkohol und Polyol Dehydrogenase wurden in einer früheren Arbeit in *G. oxydans*

621H BP.9 exprimiert und charakterisiert (Gruber 2015). Die membranständige Alkohol Dehydrogenase oxidierte ausschließlich primäre und gemischte Alkohole, die eine Alkohol-Gruppe am C1-Atom besaßen, sowie Acetaldehyd. Das Substratspektrum der Polyol Dehydrogenase wurde auch in der vorliegenden Arbeit in Ganzzell-DCPIP-Assays untersucht und umfasste 15 Substrate aus gemischten, sekundären und zyklischen Alkoholen, Zuckeralkoholen, Ketosen und Disacchariden (Kapitel 3.2.1). Auch das Substratspektrum der membranständigen Glucose Dehydrogenase mit zehn Substraten aus Aldosen, Ketosen und Disacchariden wurde in dieser Arbeit bereits erläutert (Kapitel 3.2.2). Zusätzlich wurden auch eine membranständige Sorbitol (mSDH\_Gal), sekundäre Alkohol (sekADH\_Gal) und Fucose Dehydrogenase (FuDH\_Gal) in BP.9 charakterisiert.

Die membranständige Sorbitol Dehydrogenase oxidierte ausschließlich die Zuckeralkohole D-Arabitol, *meso*-Erythritol, Glycerol, D-Mannitol, D-Sorbitol und D-Xylitol (Abbildung 3-7). Gegenüber D-Mannitol wurde mit der mSDH\_Gal die höchste in dieser Arbeit ermittelte Aktivität mit 1400  $\mu$ Units gemessen. Der Wildtypstamm *G. albidus* TMW2.1191 oxidierte D-Mannitol nur mit etwa 127  $\mu$ Units (Tabelle 3-1). Die Aktivität der mSDH\_Gal stieg somit durch Überexpression des Enzyms im Multideletionsstamm BP.9 um das 11-Fache. Die Sorbitol Dehydrogenase aus *G. suboxydans* IFO 3254 oxidierte nur D-Sorbitol und D-Mannitol, wobei die Aktivität gegenüber D-Sorbitol bei dieser Dehydrogenase 20-fach höher war als gegenüber D-Mannitol (Shinagawa et al. 1982). Die membranständigen Sorbitol Dehydrogenasen aus *G. frateurii* THD32 und *G. oxydans* DSM 3504 oxidierten ebenfalls nur D-Mannitol und D-Sorbitol (Toyama et al. 2005; Mientus et al. 2017). Die hier beschriebene FAD-abhängige Sorbitol Dehydrogenase aus *G. albidus* TMW2.1191 besitzt somit ein deutlich breiteres Substratspektrum als bisher beschriebene membranständige Sorbitol Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien und oxidierte ähnlich viele Zuckeralkohole wie Polyol Dehydrogenasen (Abbildung 3-3).

Auch die membranständige sekundäre Alkohol Dehydrogenase (SekADH\_Gal) zeigte teilweise Überschneidungen mit dem Substratspektrum von Polyol Dehydrogenasen, beschränkte sich hier aber ausschließlich auf die Oxidation von sekundären und zyklischen Alkoholen, sowie einer leichten Oxidation von L-Erythrulose (Abbildung 3-7). Bisher wurde nur eine weitere sekundäre Alkohol Dehydrogenase mit einem ähnlichen Substratspektrum von Peters et al. (2017) beschrieben, die aus einem Metagenom isoliert und *Acetobacter pasteurianus* LMG 1262 zugeordnet wurde. Beide Enzyme wurden als Glucose Dehydrogenasen annotiert, besitzen nur eine Untereinheit und oxidieren vor allem sekundäre und zyklische Alkohole. Die Substratspektren der sekundären Alkohol Dehydrogenasen umfassen 7 – 8 Substrate und stellen eine neue Art membranständiger Dehydrogenasen dar, die zuvor noch nicht bekannt war. Misst man dies an der Zahl von Spezies in der Familie der Acetobacteraceae und die Menge noch nicht untersuchter Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien, ist es sehr wahrscheinlich, dass einige weitere spezialisierte membranständige Dehydrogenasen existieren, die bisher noch nicht beschrieben wurden.

Eine weiteres Flavoprotein bestehend aus drei Untereinheiten wurde in *G. albidus* TMW2.1191 identifiziert und in der vorliegenden Arbeit charakterisiert. Das Enzym oxidierte L-Fucose und D-Saccharose und wurde daher Fucose Dehydrogenase genannt (FuDH\_Gal) (Abbildung 3-8). Ein BLASTp der Proteinsequenz der katalytischen Untereinheit von mFuDH\_Gal (A0U94\_RS10170) gegen die „nr“ Datenbank von NCBI wies auf eine sehr hohe Ähnlichkeit der Untereinheit zu NADH-abhängigen Cholin Dehydrogenasen mit bis zu 98 % Identität über die gesamte Sequenz hin. Ein BLAST der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten des Flavoproteins in Uniprot zeigte ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit zu einer Cholin Dehydrogenase aus *Gluconobacter sp.* DsW\_058. Jedoch wurde auch eine membranständige Fructose Dehydrogenasen aus einem *Gluconobacter japonicus* mit einer hohen Ähnlichkeit über 97 % angegeben. Membranständige Fructose Dehydrogenasen sind ebenfalls Flavoproteine, aufgebaut aus drei Untereinheiten und oxidieren D-Fructose zu 5-Ketofructose (Kawai et al. 2013). Die Oxidation der Saccharose durch FuDH\_Gal könnte folglich am Fructose-Molekül des Disaccharids stattgefunden haben, falls diese tatsächlich D-Fructose oxidiert. Die Aktivität der FuDH\_Gal gegenüber D-Fructose wurde im Rahmen dieser Arbeit in zwei unabhängigen Experimenten in Ganzzell-DCPIP-Assays getestet, jedoch wurde keine signifikante Aktivität über dem Schwellenwert von 25  $\mu$ Units gemessen (Daten nicht gezeigt). Die FuDH\_Gal könnte daher eine Fructose Dehydrogenase mit einer sehr geringen Aktivität gegenüber D-Fructose und zusätzlichen Aktivitäten gegenüber L-Fucose und D-Saccharose sein, oder als bisher nicht bekannte membranständige Fucose Dehydrogenase eingestuft werden.

Die Charakterisierungen der SDH\_Gal, sekADH\_Gal und FuDH\_Gal zeigen, dass membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien sehr vielfältig sind und noch nicht ausreichend untersucht wurden. Durch Charakterisierungen weiterer (unbekannter) membranständiger Dehydrogenasen könnten daher neue hoch effiziente und spezialisierte Enzyme für bestehende und neue biotechnologische Anwendungen identifiziert und eingesetzt werden.

#### **4.2.4 Analyse der Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen durch NMR-Spektroskopie**

Während die Substratspektren einiger membranständiger Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien bereits vielfach charakterisiert wurden, wurden deren Oxidationsprodukte bisher nur vereinzelt analysiert (Wei et al. 2010; Matsushita et al. 2003). Das Schema der Reaktion der Polyol Dehydrogenasen wurde bereits beschrieben und verläuft nach der Bertrand-Hudson Regel, nach der Polyole in der D-Erythro-Konfiguration am C2-Atom durch Polyol Dehydrogenasen zu der korrespondierenden Ketose oxidiert werden (Kerstens et al. 1965). Für andere weniger gut untersuchte oder neu beschriebene membranständige Dehydrogenasen sind solche Reaktionsschemata dagegen nicht bekannt. So wurde nicht abschließend geklärt, ob homologe membranständige Dehydrogenasen aus

verschiedenen Essigsäurebakterien identische Oxidationsprodukte bilden. Auch wurde bisher nicht untersucht, ob durch die Oxidation von Substraten, die wie Saccharose (Abbildung 3-8) oder L-Arabinose und D-Glucoheptose (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5), die durch verschiedene membranständige Dehydrogenasen oxidiert werden, nur zu einem Produkt oder verschiedenen Produkten führen. Aufgrund der Vielzahl der Substrate von membranständigen Dehydrogenasen und der dadurch möglichen Produkte ist ein möglichst einfaches und schnelles Verfahren zur Charakterisierung der Oxidationsprodukte nötig. Takeshita et al. (1996) untersuchten die Oxidation von Allitol durch *Gluconobacter frateurii* IF0 3254 in Biotransformationen und identifizierten L- Psicose als dessen Oxidationsprodukt durch NMR-Spektroskopie. Yakushi et al. (2018) beschrieben die Aldopentosen L-Lyxose, L-Ribose und L-Tagatose als neue Substrate einer Polyol Dehydrogenase aus *Glucoobacter* und bestimmten L-Ribonat als Oxidationsprodukt von L-Ribose ebenfalls durch NMR-Spektroskopie. Jedoch wurden die Produkte der Biotransformationen in beiden Studien vor der NMR-Messung durch Filtrationen und über Chromatographie-Säulen gereinigt (Takeshita et al. 1996; Yakushi et al. 2018), was einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand beinhaltete. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Analyse von Oxidationsprodukten membranständiger Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien durch NMR-Spektroskopie beispielhaft an der Oxidation von *cis*-1,2-Cyclohexandiol durch die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H getestet (Kapitel 3.2.4). Anders als in den vorherigen Studien wurde auf eine Aufreinigung des Oxidationsprodukts vor der Analyse durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie verzichtet und die Messung direkt mit Proben aus Überständen von Biotransformationen durchgeführt (Kapitel 2.4.4). Durch dieses Vorgehen ergab sich eine erhebliche Arbeits- und Zeitersparnis, die in folgenden Arbeiten eine schnelle Analyse und damit eine Kartierung der Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ermöglichen sollte. In den Überständen der Biotransformation wurde 2-Hydroxy-Cyclohexanon eindeutig als Produkt der Oxidation von *cis*-1,2-Cyclohexandiol mit der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H identifiziert, dass sich anschließend zu einem Dimer zusammen lagerte (Abbildung 3-9). Die Oxidation von *trans*- und *cis*-1,2-Cyclohexandiol durch *Gluconobacter oxydans* zu 2-Hydroxy-Cyclohexanon wurde bereits beschrieben, jedoch war zu diesem Zeitpunkt das verantwortliche Enzym noch unbekannt (Adlercreutz 1989). 2-Hydroxy-Cyclohexanon dient als Zwischenprodukt zur Herstellung von Tetrahydrocarbazol-Verbindungen und als Vorstufe zur Herstellung von Brenzcatechin (Tronich und Wykiel 1985). Durch Aufklärung weiterer noch unbekannter Oxidationsprodukte membranständiger Dehydrogenasen könnten daher neue industriell relevante (Zwischen-)Produkte identifiziert und neue biotechnologische Verfahren mit Essigsäurebakterien einwickelt werden.

### 4.3 Produktion von L-Erythrose mit BP.9-Expressionsstämmen

L-Erythrose wird als Bestandteil von Selbstbräunern in der Kosmetikindustrie verwendet und industriell durch Fermentation mit *G. oxydans* Zellen hergestellt. Beim Auftragen auf die Haut verfärbt sich L-Erythrose auf der oberen Hautschicht durch Reaktion mit freien Aminogruppen von Peptiden oder Proteinen bräunlich (Jermann et al. 2002). Die Oxidation von *meso*-Erythritol zu L-Erythrose durch *G. oxydans* wurde erstmals von Whistler und Underkofler (1938) beschrieben. Die bioprozesstechnischen Aspekte und Problemstellungen der Erythrose-Produktion mit *Gluconobacter* wurden schon in mehreren Studien diskutiert (Vorlop et al. 2009; Pan et al. 2016; Burger et al. 2019). Jedoch wurde bisher keine systematische Optimierung des Produktionsstammes vorgenommen. Die Verwendung des Multideletionsstammes *G. oxydans* 621H BP.9, der von Peters et al. (2013) entwickelt wurde und in dem die membranständigen Dehydrogenasen deletiert wurden, ermöglichte in der vorliegenden Arbeit die gezielte Untersuchung der Oxidation von *meso*-Erythritol durch verschiedene Polyol Dehydrogenasen, sowie die Auswahl geeigneter Promotoren und den Vergleich der Plasmid-basierten und chromosomalen Expression der *sldAB*-Gene (Kapitel 3.3).

Zu Beginn wurde die Oxidation von *meso*-Erythritol und die Bildung von L-Erythrose mit den bereits in Kapitel 3.2.1 charakterisierten Polyol Dehydrogenasen und dem Wildtypstamm *G. oxydans* 621H in Schüttelkolben mit 10 g L<sup>-1</sup> *meso*-Erythritol untersucht. Die *sldAB*-Gene wurden auf dem Plasmid pMM3b unter Kontrolle des mADH-Promotors aus *G. oxydans* 621H in BP.9 exprimiert. Durch die Deletion der nativen membranständigen Dehydrogenasen in BP.9 sollten unerwünschte Neben- und Folgereaktionen verhindert und die Anzahl der Polyol Dehydrogenasen im Periplasma durch Vergrößerung des limitierten Platzes in der Cytoplasmamembran erhöht werden. Es wurde daher vermutet, dass dadurch auch die Effizienz der Katalyse insgesamt gesteigert werden könnte. Bei den in dieser Arbeit getesteten Polyol Dehydrogenasen erwies sich die Mehrheit jener aus *Gluconobacter* als geeigneter zur Produktion von L-Erythrose als Polyol Dehydrogenasen aus *Komagataeibacter* (Abbildung 3-10). Schon die Ergebnisse der Ganzzell-DCPIP-Assays des Wildtypstammes und der Expressionsstämme (Tabelle 3-1 und Abbildung 3-2) ließen eine leichte Erhöhung der Oxidationsaktivität gegenüber *meso*-Erythritol mit den Expressionsstämmen BP.9 pMM4a-mSldAB (93 µUnits) und BP.9 pADH-SldAB\_Gal (100 µUnits) im Vergleich zu *G. oxydans* 621H (84 µUnits) vermuten. Ein Vergleich von BP.9 pMM4b-mSldAB, BP.9 pADH-SldAB\_Gal und *G. oxydans* 621H pMM2 in Schüttelkolben-Experimenten zeigte zwar diesen Unterschied der Oxidationsaktivität durch Überexpression der Polyol Dehydrogenasen in BP.9 pMM4a-mSldAB und BP.9 pADH-SldAB\_Gal, es wurde aber keine signifikante Steigerung der L-Erythrose-Ausbeute gemessen (Tabelle 3-5). Eine Überexpression der *sldAB*-Gene allein im Multideletionsstamm BP.9 führte daher nicht zur erwarteten Verbesserung der Oxidationsaktivität. Ein möglicher Grund dafür könnte die Kapazität der Atmungskette oder der Sauerstoffeintrag im Schüttelkolben während des Experiments gewesen sein. Die bei der Oxidation entstehenden Elektronen werden über PPQ und einen Ubiquinon-Pool an die

terminale Oxidase weitergegeben, die diese auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor überträgt. Fließen die Elektronen nicht schnell genug ab, kann das zu einer Limitierung der Oxidationsgeschwindigkeit führen (Meyer et al. 2013; Kostner et al. 2015). Bei der Ganzzellkatalyse zur Oxidation von D-Glucose führte die Überexpression der nativen membranständigen Glucose Dehydrogenase (mGDH\_621H) im Expressionsstamm BP.9 pMM4a-mGDH jedoch zur zweifachen Gluconat-Ausbeute und die Überexpression der membranständigen Glucose Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 3504 (mGDH1\_3504) im BP.9 pADH-mGDH1\_3504 zur dreifachen Gluconat-Ausbeute im Vergleich zu *G. oxydans* 621H pMM2 (Kapitel 3.4.1). Auch Meyer et al. (2013) verzeichneten einen 3- bis 5-fachen Anstieg der mGDH-Aktivität bei Überexpression des *mGDH*-Gens in *G. oxydans* 621H. Die Limitierung der Oxidationsaktivität von membranständigen Dehydrogenasen durch die Kapazität der Atmungskette ist daher zwar möglich, jedoch bei einer Aktivitätssteigerung von nur rund 20 % bei Überexpression der Polyol Dehydrogenasen eher unwahrscheinlich.

Probleme könnten auch in der korrekten Faltung und Zusammensetzung der beiden Untereinheiten der Polyol Dehydrogenase aufgetreten sein und damit die Zahl der aktiven Enzyme verringert haben. Eine weitere Strategie bestand daher in der Optimierung der Expressionsraten durch Testen verschiedener Promotoren für die Expression der *sldAB\_621H*-Gene (Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Insgesamt wurden acht Promotoren zur Expression der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H auf dem Plasmid pMM3b und vier Promotoren zur chromosomalen Expression untersucht. Merfort et al. (2006b) nutzten den Promotor des Elongationsfaktors Tu aus *G. oxydans* 621H zur Überexpression der *sldAB* Gene aus *G. oxydans* 621H, um 5-Keto-D-Gluconat herzustellen. Auch Gätgens et al. (2007), Meyer et al. (2013) und Li et al. (2016) nutzten den Promotor der membranständigen Glucose und Gluconat-2-Dehydrogenase sowie ribosomale Promotoren für die Expression einer Polyol Dehydrogenase bzw. einer membranständigen Glucose und Gluconat-2-Dehydrogenase aus *G. oxydans*, um die Auswirkungen der Überexpression auf die Aktivität der Enzyme zu beurteilen. Die Wahl fiel daher auf Promotoren verschiedener membranständiger Dehydrogenasen (Prom<sub>mADH</sub>, Prom<sub>G2DH</sub>, Prom<sub>mIDH</sub>, Prom<sub>mSDH</sub>, Prom<sub>SldAB</sub>), ein ribosomaler Promotor (Prom<sub>452</sub>) und der Promotor des Elongationsfaktors Tu (Prom<sub>TuFB</sub>) aus *G. oxydans* 621H, die schon zuvor für die Expression membranständiger Dehydrogenasen verwendet wurden (Merfort et al. 2006a; Kallnik et al. 2010; Kataoka et al. 2015; Mientus et al. 2017).

Die Promotoren wurden dabei mit Plasmid-basierter Expression und später auch zum Teil durch chromosomale Expression der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H (*SldAB\_621H*) getestet, da eine stabile chromosomale Expression der Polyol Dehydrogenase im Hinblick auf die Entwicklung von industriellen Produktionsstämmen von hoher Bedeutung war. Dadurch kann der Einsatz von Antibiotika, die bei Expression der Enzyme mit Plasmiden nötig sind, vermieden und die Downstream-Prozesse zur Isolation der L-Erythrose vereinfacht werden. Die besten Ergebnisse sowohl für eine Plasmid-basierte als auch für eine chromosomale Expression der *SldAB\_621H* wurden nicht mit Promotoren membranständiger Dehydrogenasen erzielt, sondern mit dem Promotor des

Elongationsfaktors Tu aus *G. oxydans* 621H (GOX\_RS03065). Die Produktausbeute nach 4 h Inkubationszeit erhöhte sich dabei gegenüber den Referenzstämmen *G. oxydans* 621H pMM2 bzw. *G. oxydans* 621H jeweils um das 1,6-Fache (BP.9 pJV17; Tabelle 3-6) bzw. 1,8-Fache (BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>*; Tabelle 3-8). Die Ergebnisse bei Verwendung des TufB-Promotors stehen in guter Übereinstimmung mit anderen Resultaten, bei denen der TufB-Promotor zur Überexpression von membranständigen Dehydrogenasen mit vergleichbaren Expressionsplasmiden eingesetzt wurde (Gätgens et al. 2007; Hu et al. 2015; Li et al. 2016; Merfort et al. 2006a). Li et al. (2016) steigerten bei der Überexpression der Gluconat-2-Dehydrogenase in *G. oxydans* DSM 2003 mit dem TufB-Promotor aus *G. oxydans* 621H die Ausbeute an 2-Keto-D-Gluconat um das Doppelte. Auch eine Steigerung der D-Gluconat und D-Sorbitol Oxidation um 146 % bzw. 71 % wurde durch die Überexpression der nativen Polyol Dehydrogenase mit dem nativen TufB-Promotor in *G. oxydans* MF1 erreicht (Merfort 2006). Gätgens et al. (2007) steigerten durch Überexpression der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H mit dem TufB-Promotor die Oxidation von Glycerol zu Dihydroxyaceton um etwa 80 %. Die Ergebnisse der Studien deckten sich somit gut mit den hier ermittelten Ergebnissen, obwohl die Studien von Merfort et al. und Gätgens et al. mit wachsenden *G. oxydans* Zellen durchgeführt wurden.

Interessanterweise zeigte sich auch, dass die Expression der Polyol Dehydrogenase vom Plasmid und vom Chromosom trotz eines identischen Promotors zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Bei Verwendung des nativen Promotors der *sldAB*-Gene wurden durch Expression auf dem Plasmid nach 4 h Inkubation etwa 55 % weniger L-Erythrose produziert als in BP.8, bei dem die Gene nativ exprimiert wurden (Tabelle 3-6 und Tabelle 3-8). Bei Expression der *sldAB*-Gene mit dem Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase verhielt sich die Produktausbeute umgekehrt. Die Plasmid-basierte Expression der *SldAB\_621H* lieferte 22 % (BP.9 pLG2DH-*sldAB\_621H*) bzw. 42 % (BP.9 pG2DH-*sldAB\_621H*) mehr L-Erythrose als die chromosomale Expression (BP.9  $\Delta g2dh::sldAB$ ). Grund hierfür könnten regulatorische Bereiche *upstream* der Promotor-Sequenzen sein, die die Expression der *sldAB*-Gene beeinflussen. Dies zeigt sich besonders beim Promotor der Gluconat-2-Dehydrogenase, bei dem mit Verkürzung des Promotors vom Chromosom zu 326 bp- und 191 bp-Fragmenten auf den Expressionsplasmiden die Ausbeute an L-Erythrose stieg. Eine genaue Regulation der Expressionsstärke schien daher essenziell, um eine optimale Aktivitätssteigerung der Polyol Dehydrogenase zu erhalten. Schon Merfort et al. (2006b) beschrieben, dass das Expressionslevel der *SldAB* aus *G. oxydans* 621H durch Überexpression zwar um ein Vielfaches erhöht werden kann, die Aktivität parallel jedoch nur um etwa 60 % stieg. In der gleichen Studie führte die Überexpression der membranständigen Glucose Dehydrogenase zu einer 6- bis 9-fachen Steigerung der mGDH-Aktivität. Daher ist denkbar, dass bei hohen Expressionsraten die Zahl der aktiven *SldAB*-Enzyme beispielsweise durch fehlerhafte Faltung limitiert sein könnte und daher auch die Steigerung der Aktivität der Polyol Dehydrogenase in Expressionsstämmen begrenzt ist.

Es wurden schon zuvor einige Studien zur Produktion von L-Erythrose mit *Gluconobacter* durchgeführt, wo bereits hohe Erythrose-Ausbeuten und Konzentrationen erreicht werden konnten

(Vorlop et al. 2009; Pan et al. 2016; Burger et al. 2019). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Studien mit hier ermittelten Daten ist schwierig, da dort die Biotransformation in Fermentern unter kontrollierten Bedingungen mit deutlich höherem Sauerstoffeintrag durchgeführt wurden, während in der vorliegenden Arbeit die L-Erythrulose-Produktion in Schüttelkolben bestimmt wurde. Jedoch nutzten Burger et al. (2019) ebenfalls den Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.8, mit dem eine hohe zellspezifische Produktausbeute für die L-Erythrulose Produktion beschrieben und damit die Vorteile des Einsatzes von Multideletionsstämmen demonstriert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Ausbeute an L-Erythrulose durch den Austausch des nativen Promotors in BP.8 mit dem *tufB*-Promotor in den ersten vier Stunden der Biotransformation um 40 % signifikant gesteigert wurde ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Abbildung 3-12). Somit ist es wahrscheinlich, dass auch in Fermentationen mit hohen *meso*-Erythritol-Konzentrationen und unter kontrollierten Bedingungen mit BP.8 *sldAB::tufB<sub>Prom</sub>* im Vergleich zu BP.8 höhere zellspezifische Produktausbeuten erreicht werden.

#### 4.4 Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose

5-Ketogluconat ist für die Herstellung von L-(+)-Weinsäure und Ascorbinsäure von besonderer Bedeutung. L-(+)-Weinsäure dient als wichtiger Ausgangsstoff für eine Vielzahl von asymmetrischen Synthesen (Gawroński und Gawrońska 1999; Ghosh et al. 2001) und wird in der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie beispielsweise als Säuerungs- und Konservierungsmittel, Antioxidans oder zur Ledergerbung eingesetzt (Hölscher et al. 2009; Gurtler und Mai 2014; Nashy und Eid 2018). Traditionell wird Weinsäure aus Weinstein gewonnen, das als Nebenprodukt in der Herstellung von Wein anfällt. Die Verfügbarkeit der Weinsäure ist jedoch aufgrund der Abhängigkeit von der Weinherstellung limitiert und die Qualität des Ausgangsstoffes schwankend. Alternativ kann Weinsäure aus 5-Keto-D-Gluconat gewonnen werden, indem es mit Vanadium als Katalysator in L-(+)-Weinsäure und Oxalsäure gespalten wird (Klasen et al. 1992; Matzerath et al. 1995), wodurch eine uneingeschränkte Verfügbarkeit der L-(+)-Weinsäure mit gleichbleibender Qualität gewährleistet wird. Ausgehend von 5-Keto-D-Gluconat kann auch die Produktion von Vitamin C nach der von Gray (1945) beschriebenen Methode über L-Idonat und 2-Keto-L-Gulonsäure erfolgen (Abbildung 1-1). Kommerziell wird Vitamin C derzeit mit dem Reichstein-Grüssner-Verfahren (Reichstein und Grüssner 1934) oder der Sonoyama-Methode (Sonoyama et al. 1982) aus D-Glucose produziert. Die Intermediate dieser Synthesen, L-Sorboson und 2,5-Diketo-D-Gluconat, sind jedoch instabil und so bietet die Synthese der Ascorbinsäure über das stabile 5-Keto-D-Gluconat eine effektive Alternative (Adachi et al. 2003). Die Verfügbarkeit von effizienten Produktionsstämmen ist daher ausschlaggebend für die Rentabilität der biotechnologischen Produktion von Vitamin C über die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein bakterieller Produktionsstamm für eine effiziente Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-

Glucose etabliert werden. Die Oxidation von D-Glucose zu 5-Keto-D-Gluconat wird in Essigsäurebakterien durch membranständige Dehydrogenasen im Periplasma oder cytoplasmatische NADH-abhängige Dehydrogenasen katalysiert. Es wurde bereits gezeigt, dass die Oxidation von D-Glucose hauptsächlich im Periplasma von *G. oxydans* katalysiert wird und die Aktivität der PQQ-abhängigen Glucose Dehydrogenase 27-mal höher ist als die Aktivität der cytosolischen NADH-abhängigen Glucose Dehydrogenase (Pronk et al. 1989; Hanke et al. 2013). Um einen Produktionsstamm für 5-Keto-D-Gluconat zu etablieren lag der Fokus in dieser Arbeit folglich ausschließlich auf der Katalyse der Reaktion mit membranständigen Dehydrogenasen. Die katalysierte Reaktion lief in *G. oxydans* 621H zweistufig. D-Glucose wurde durch die membranständige Glucose Dehydrogenase zu D-Gluconat oxidiert, das durch die Polyol Dehydrogenase zu 5-Keto-D-Gluconat umgesetzt wurde. Die Katalyse beider Teilschritte wurde in Kapitel 3.4 getrennt und gemeinsam betrachtet.

#### 4.4.1 Katalyse der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat

Die Oxidation der D-Glucose wurde durch sechs membranständige Glucose Dehydrogenasen aus sechs verschiedenen Essigsäurebakterien der Gattungen *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* und *Komagataeibacter* katalysiert, die einzeln im Multideletionsstamm BP.9 exprimiert wurden (Kapitel 3.4.1). Die Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat verlief bei den Expressionsstämmen deutlich schneller als beim Referenzstamm *G. oxydans* 621H pMM2 und die Konzentration an D-Gluconat war bei BP.9 pADH-mGDH\_Gal, BP.9 pADH-mGDH1\_3504 und BP.9 pADH-mGDH\_PA15 verglichen mit *G. oxydans* 621H pMM2 über den gesamten Zeitraum der Biotransformation signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Abbildung 3-13). Damit wurden auch die Ergebnisse der vorherigen Ganzzell-DCPIP-Assays bestätigt, in denen die drei Expressionsstämme ebenfalls die höchsten Oxidationsraten gegenüber D-Glucose aufwiesen (Abbildung 3-5) und das Oxidationspotenzial von *G. oxydans* 621H deutlich überstiegen (Tabelle 3-1). Die höchsten Konversionsraten und Produktausbeuten von D-Gluconat wurden durch mGDH1\_3504 und mGDH\_Gal erreicht, die in 6 h etwa 60 % der eingesetzten D-Glucose oxidierten (Tabelle 3-9). Die Kombination des Multideletionsstammes BP.9 und die Überexpression einer membranständigen Glucose Dehydrogenase lieferte damit die angestrebte Verbesserung der Glucose-Oxidation und verdreifachte die Gluconat-Ausbeute von *G. oxydans* 621H nach 6 h bzw. verdoppelte sie nach 24 h (Abbildung 3-13). Es wurde jedoch mit keinem der getesteten Stämme ein vollständiger Umsatz der eingesetzten D-Glucose erreicht, da sich die Produktion von D-Gluconat nach 6 h vor allen bei Stämmen mit schneller Oxidation deutlich verlangsamte. Die maximale Gluconat-Konzentration lag nach 24 h bei  $8,5 \text{ g L}^{-1}$  mit BP.9 pADH-mGDH\_Gal (Abbildung 3-13 C). Bis auf BP.9 pADH-mGDH1\_3504 lag bei allen Stämmen auch die spezifische Produktausbeute nach 6 h nur zwischen 0,6 und 0,9 (Tabelle 3-9). Es wurde also mehr D-Glucose verbraucht als D-Gluconat gebildet. Die Abgabe des gebildeten Gluconats in das umgebende

Medium kann jedoch etwas zeitverzögert stattgefunden haben, was die spezifische Produktausbeute leicht verzerrte. Dies traf vor allem auf die Expressionsstämme zu, bei denen sich  $Y_{p/S}$  nach 24 h deutlich besserte und wieder zwischen 0,9 und 1,0 lag. Nur *G. oxydans* 621H pMM2 hatte auch nach 24 h doppelt so viel D-Glucose verbraucht, wie D-Gluconat gebildet (Abbildung 3-13 B und D). Da D-Glucose und D-Gluconat auch im zentralen Stoffwechsel durch NADH-abhängige Dehydrogenasen oxidiert werden, lässt sich vermuten, dass ein Teil der D-Glucose oder des gebildeten D-Gluconats in die Zelle aufgenommen wurde und so nicht im Medienüberstand gemessen werden konnte (Hanke et al. 2013). Vor allem für niedrige Glucose-Konzentrationen wurde angenommen, dass D-Glucose bevorzugt in die Zelle aufgenommen wird und die Oxidation im Periplasma eine weniger bedeutende Rolle einnimmt (García-García et al. 2017). Da die spezifische Produktausbeute jedoch nur bei *G. oxydans* 621H pMM2 auch nach 24 h einen so niedrigen Wert aufwies und das gebildete D-Gluconat bei den Ansätzen mit den Expressionsstämmen im Medium nachweisbar blieb, ist es wahrscheinlich, dass durch die langsamere Oxidation von *G. oxydans* 621H pMM2 mehr D-Glucose bzw. D-Gluconat in die Zelle aufgenommen wurde. Auch bei Biotransformationen ohne das Referenzplasmid pMM2 zeigte *G. oxydans* 621H eine zu Expressionsstämmen deutlich geringere spezifische Produktausbeute (Tabelle 3-14) Die Transporter in *G. oxydans* 621H, die für den Transport von D-Glucose oder D-Gluconat verantwortlich sind, wurden bisher jedoch noch nicht identifiziert.

#### 4.4.2 Produktion von 5-Keto-D-Gluconat

Die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat mit *G. oxydans* 621H wurde in einem einstufigen Prozess durch Oxidation von D-Gluconat mit Polyol Dehydrogenasen in Kapitel 3.4.2 und in einem zweistufigen Prozess durch Oxidation von D-Glucose über D-Gluconat mit membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen in Kombination in Kapitel 3.4.3 betrachtet. Schnell stellte sich heraus, dass vor allem der zweite Oxidationsschritt von D-Gluconat der limitierende Faktor in der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat war. Die Oxidation der D-Glucose erzielte sowohl bei alleiniger Expression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen als auch bei kombinierter Expression von membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9 gute Konversionsraten von D-Glucose und Produktausbeuten von über 50 % D-Gluconat innerhalb weniger Stunden (Abbildung 3-13 und Abbildung 3-18). 5-Keto-D-Gluconat konnte dagegen nur in geringen Konzentrationen produziert werden. Schon bei Betrachtung der Biotransformation von D-Gluconat als Substrat mit sechs Expressionsstämmen, die nur eine Polyol Dehydrogenase exprimierten, wurden nur niedrige Umsätze erzielt (Kapitel 3.4.2). Bei ersten Versuchen mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  D-Gluconat in  $67 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer mit pH 5 wurden maximal  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat mit BP.9 pMM4a-mSldAB erreicht (Abbildung 3-14). Auch in vorangegangenen Ganzzell-DCPIP-Assays lieferte die Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H die höchste Aktivität gegenüber D-Gluconat mit 25  $\mu\text{Units}$  (Abbildung 3-4). Das Oxidationspotenzial von BP.9 pADH-mGDH1\_3504 gegenüber D-Glucose mit

950  $\mu$ Units war also 38-fach höher als das von BP.9 pMM4a-mSldAB gegenüber D-Gluconat. Daher war es nicht überraschend, dass die Oxidation von D-Gluconat mit Polyol Dehydrogenasen deutlich langsamer ablief als die Oxidation von D-Glucose mit membranständigen Glucose Dehydrogenasen. Eine weitere membranständige Dehydrogenase aus *X. campestris* DSM 3586 wurde zusätzlich zu den Polyol Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien für die Oxidation von D-Gluconat untersucht. Yuan et al. (2016b) exprimierten die membranständige sekundäre Alkohol Dehydrogenase (Gcd\_XC3586) in *G. oxydans* 621H, in dem zuvor die Gluconat-2-Dehydrogenase deletiert wurde und beschrieben eine 7-fach höhere Aktivität der Gcd\_XC3586 gegenüber D-Gluconat als die native Polyol Dehydrogenase SldAB\_621H. Bei Überexpression der Gcd\_XC3586 im Multideletionsstamm BP.9 wurde nur eine Aktivität von 35  $\mu$ Units gegenüber D-Gluconat ermittelt (Abbildung 3-15). Im Vergleich zu BP.9 pMM4a-mSldAB entsprach das einer Aktivitätssteigerung von 40 %, die jedoch nicht signifikant war. Allerdings wurden in den Versuchen von Yuan et al. die *sldAB*-Gene in *G. oxydans* 621H nicht deletiert, weshalb sich die dort gemessene Aktivität gegenüber D-Gluconat sich vermutlich aus den Aktivitäten der Gcd\_XC3586 und der nativen SldAB\_621H zusammensetzte.

Eine weitere Strategie zur Steigerung der Gluconat-Oxidation bestand in der Verbesserung der Bedingungen der Katalyse während der Biotransformation. Mehrere Parameter beeinflussen die Bildung von 5-Keto-Gluconat aus D-Gluconat mit *G. oxydans* (García-García et al. 2017). Die eingesetzte Substratkonzentration und der pH-Wert des  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffers wurden als solche Parameter für die Ketogluconat-Produktion ausgewählt und in Biotransformationen mit BP.9 pMM4a-mSldAB variiert. Die Verdoppelung der Gluconat-Konzentration von 10 g  $\text{L}^{-1}$  auf 20 g  $\text{L}^{-1}$  erhöhte die Konzentration von 5-Keto-D-Gluconat nach 24 h von 0,3 g  $\text{L}^{-1}$  auf 1,1 g  $\text{L}^{-1}$  und verdoppelte damit fast die Konversionsrate von 3 % auf 5,5 % (Abbildung 3-16). Bei einer weiteren Steigerung auf anfängliche 40 g  $\text{L}^{-1}$  D-Gluconat blieb die Konversionsrate mit 6,25 % nach 24 h Inkubation auf einem ähnlich Niveau wie mit 20 g  $\text{L}^{-1}$  D-Gluconat (Abbildung 3-16). Denkbar ist, dass durch die Durchführung der Biotransformationen in Schüttelkolben die Katalyse der Gluconat-Oxidation bei höheren Substratkonzentrationen durch eine niedrige Sauerstoffeintragsrate deutlich eingeschränkt war. Auch bei Versuchen mit dem Expressionsstamm BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH, der die native membranständige Glucose und Polyol Dehydrogenase exprimierte, stieg die Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat nur in den ersten 8 h der Biotransformation kontinuierlich an und stagnierte, nachdem etwa 5 g  $\text{L}^{-1}$  D-Gluconat gebildet worden waren, bei einer Konzentration von 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-18). Dies deckt sich mit weiteren Studien, die ebenfalls eine Inhibition der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat bei höheren Gluconat-Konzentrationen beschrieben (Burger 2019; Merfort et al. 2006b). Ein weiterer Parameter, der großen Einfluss auf die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat hat, ist der pH-Wert des Mediums bzw. des Puffers. Mehrere Studien beschreiben einen pH von 4,5 bis 5 als ideal für die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat (Elfari et al. 2005; Merfort et al. 2006a; Yuan et al. 2016a; Krajewski et al. 2010), andere geben das pH-Optimum der Polyol Dehydrogenase für die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 4,5 an (Matsushita et al. 2003; Ano et al.

2011; Yuan et al. 2016a). Daher wurde die Aktivität der Expressionsstämme BP.9 pMM4a-mSldAB, BP.9 pADH-sldAB\_Gal, BP.9 pADH-sldAB1\_3504, BP.9 pADH-sldAB2\_3504, BP.9 pADH-sldAB\_hans und BP.9 pADH-sldAB\_med und des Referenzstammes *G. oxydans* 621H pMM2 gegenüber D-Gluconat bei pH 5 in 67 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer und bei pH 4 in McIlvaine-Puffer verglichen (Abbildung 3-17). Es zeigte sich, dass die Aktivität gegenüber D-Gluconat im McIlvaine Puffer mit pH 4 bei allen Expressionsstämmen deutlich zunahm und das Zwei- bis Dreifache der Aktivität bei pH 5 betrug. Dies zeigte auch eine Studie von Matsushita et al. (2003), in der die Produktivität der 5-Keto-D-Gluconat-Bildung von *G. suboxydans* IFO 3257 bei pH 4 etwa 3-mal höher lag als bei pH 5. Auch andere Studien beschrieben für die Aktivität von Polyol Dehydrogenasen ein pH-Optimum bei pH 4 (Ano et al. 2011; Yuan et al. 2016a). Während in der vorliegenden Arbeit nur BP.9 pMM4a-mSldAB bei pH 5 D-Gluconat mit einer Aktivität oberhalb des Schwellenwertes von 25 µUnits oxidierte, lagen bei einem pH-Wert von 4 die Aktivitäten von BP.9 pADH-sldAB\_Gal, BP.9 pADH-sldAB2\_3504 und BP.9 pADH-sldAB\_med ebenfalls über dem Schwellenwert von 25 µUnits. Die höchste Aktivität bei pH 4 mit 80 µUnits wurde nach wie vor mit BP.9 pMM4a-mSldAB erzielt. Gegensätzlich zu den Expressionsstämmen nahm die Aktivität von *G. oxydans* 621H pMM2 bei pH 4 gegenüber pH 5 um etwa 40 % ab (Abbildung 3-17). Dadurch lässt sich vermuten, dass die membranständige Gluconat-2-Dehydrogenase für einen großen Teil der gemessenen Aktivität in *G. oxydans* 621H pMM2 gegenüber D-Gluconat in Ganzzell-DCPIP-Assays verantwortlich war, da diese ihr pH Optimum bei pH 5 besitzt und bei einem pH-Wert von 4 deutlich weniger aktiv ist (Matsushita et al. 2003).

In einem zweistufigen Prozess in Schüttelkolben war jedoch eine Kontrolle des pH-Wertes nicht möglich. Zu Beginn der Biotransformation war zudem vor allem die Katalyse der ersten Teilreaktion und damit das pH-Optimum der membranständigen Glucose Dehydrogenase entscheidend, das etwa bei pH 5 bis 6 liegt (Ameyama et al. 1981a; Sará-Páez et al. 2015). Es wurde davon ausgegangen, dass sich der pH während der Biotransformation an das pH-Optimum der Polyol Dehydrogenase anpasste, da das gebildete D-Gluconat das Medium ansäuern und den pH absenken sollte. Mit sinkenden pH von 5 auf 4 sollte das pH-Optimum der Polyol Dehydrogenase erreicht sein und das D-Gluconat weiter zu 5-Keto-D-Gluconat oxidiert werden (Weenk et al. 1984; Silberbach et al. 2003; Yuan et al. 2016b). Die Katalyse beider Teilschritte mit einer membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase wurde ebenfalls in Biotransformationen mit Expressionsstämmen basierend auf dem Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 in Schüttelkolben untersucht (Kapitel 3.4.3). Die Expression der membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase erfolgte zunächst wieder auf dem Plasmid pMM3b mit den beiden nativen Enzymen von *G. oxydans* 621H (BP.9 pADH-sldAB\_pG2DH-mGDH, BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH, BP.9 pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH und BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH) oder der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H und der membranständigen Glucose Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 (BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH1\_3504 und BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504). Der Verlauf der Biotransformationen mit deren Konversionsraten und Produktausbeuten mit Expression einer membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase zeigte

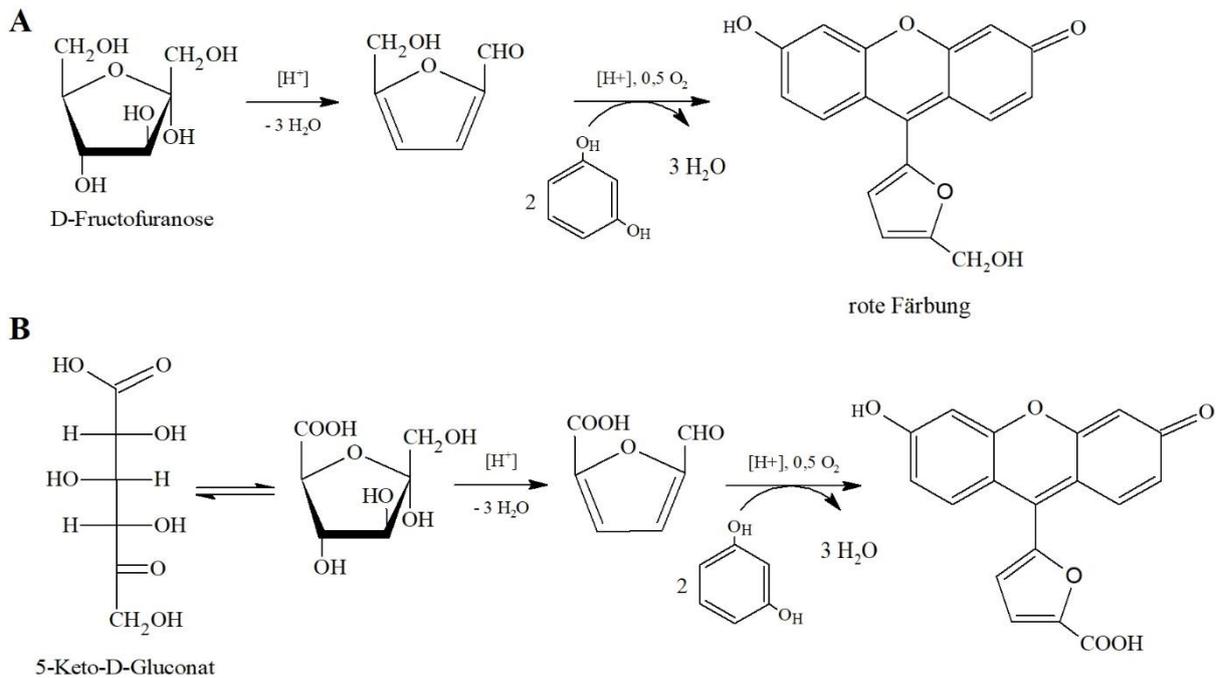
wie schon bei alleiniger Expression der membranständigen Glucose Dehydrogenasen (Kapitel 3.4.1) eine schnelle Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat (Abbildung 3-18 und Tabelle 3-12). Nur BP.9 pADH-sldAB\_pmGDH-mGDH bildete kein D-Gluconat aus D-Glucose. Da hier die mGDH\_621H mit einer kürzeren Version des nativen Promotors der membranständigen Glucose Dehydrogenase exprimiert wurde als in BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH, ist es denkbar, dass die Promotorsequenz für eine stabile Expression nicht ausreichte. Die besten Umsätze an D-Glucose und die höchsten Ausbeuten an D-Gluconat innerhalb der ersten Stunden der Biotransformation erreichten die Expressionsstämme BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH und BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504, 5-Keto-D-Gluconat wurde dagegen nicht gebildet (Abbildung 3-18). Die Produktion von D-Gluconat konnte durch Überexpression der membranständigen Glucose Dehydrogenase in BP.9 pADH-sldAB\_pG2DH-mGDH, BP.9 pADH-sldAB\_pLG2DH-mGDH, BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH und BP.9 pSldAB-sldAB\_pADH-mGDH1\_3504 signifikant erhöht werden ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test). Für die Oxidation von D-Gluconat erzielte BP.9 pADH-sldAB\_pLmGDH-mGDH die besten Werte mit einer Ausbeute von  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat nach 8 h und steigerte damit die Produktion an 5-Keto-D-Gluconat bei einem Vergleich zu *G. oxydans* 621H pMM2 ebenfalls signifikant ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test; Abbildung 3-18 G und H). Auch bei einer chromosomalen Expression einer membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenase in BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  und BP.8  $\Delta madh::mgdh1_{3504}$  wurden ähnliche Ergebnisse wie bei Biotransformationen mit Plasmid-basierter Expression sichtbar (Abbildung 3-19 und Tabelle 3-14). BP.8  $\Delta madh::mgdh1_{3504}$  mit Expression der membranständigen Dehydrogenase 1 aus *G. oxydans* DSM 3504 wies im Vergleich zu *G. oxydans* 621H eine signifikant höhere Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat auf ( $p \leq 0,05$ , ungepaarter t-Test), bildete jedoch kein 5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-19 B und D). Der Verlauf der Gluconat-Bildung von BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  war dagegen ähnlich zu *G. oxydans* 621H. BP.8  $\Delta mgdh::mgdh_{621H}$  produzierte dafür aber signifikant mehr 5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-19 B und D). Nichtsdestotrotz bleibt die Ausbeute an 5-Keto-D-Gluconat sowohl bei Plasmid-basierter Expression der membranständigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H BP.9 als auch bei chromosomaler Expression weit unter den Erwartungen. Die hohe Aktivität der membranständigen Glucose Dehydrogenasen gegenüber D-Glucose führte zwar zu einer schnellen Bildung von D-Gluconat und ermöglichte zu Beginn die folgende Oxidation zu 5-Keto-D-Gluconat, jedoch stagnierte die Katalyse der zweiten Teilreaktion bereits nach wenigen Stunden (Abbildung 3-18 und Abbildung 3-19). Es wurde vermutet, dass aufgrund der vielfach höheren Aktivität der membranständigen Glucose Dehydrogenase im Vergleich zur Polyol Dehydrogenase die Kapazität der Atmungskette über lange Zeit der Biotransformation durch die Glucose-Oxidation ausgelastet wurde, was nur eine geringe Katalyse der Gluconat-Oxidation ermöglichte (Levering et al. 1988; Meyer et al. 2013). Mit zunehmender Gluconat-Konzentration könnte wiederum der pH-Wert eine wichtige Rolle gespielt haben, da ein zu weites Absenken des pH-Wertes als Folge der schnellen Gluconat-Bildung die Bildung von Ketogluconaten verhindert (Weenk et al. 1984). Yuan et al. (2016a) untersuchten ebenfalls

die Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose mit *G. oxydans* und zeigten eine Limitierung der Ganzzellkatalyse mit *G. oxydans* durch die Kapazität der Atmungskette, Kofaktoren und dem pH-Wert. Sie steigerten die 5-Keto-D-Gluconat Ausbeute sukzessive, indem neben der Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase und Überexpression der *sldAB*-Gene auch PQQ-Synthesegene (*pqqABCDE*) und die Gene der terminalen Cytochrom-bo3-Ubiquinol-Oxidase (*cyoBACD*) überexprimiert wurden. Zusätzlich wurde der pH-Wert nach der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconat von pH 5,5 auf pH 4,5 abgesenkt. Dadurch wurde die Produktivität in einem Zulaufverfahren im Vergleich zum Ausgangsstamm *G. oxydans* 621H um das 10-Fache gesteigert und letztlich 162 g L<sup>-1</sup> 5-Ketogluconat innerhalb von 64 h erreicht. Es wurde jedoch auch deutlich, dass auch die Sauerstoffeintragsrate in Schüttelkolben die Katalyse der Glucose- und Gluconat-Oxidation im Vergleich zu Fermentern mit Rührwerk erheblich einschränkte, da Yuan et al. (2016a) nur durch Kombination der Überexpression der *sldAB*-Gene und Deletion der Gluconat-2-Dehydrogenase etwa 122 g L<sup>-1</sup> 5-Ketogluconat produzieren konnten. In der Dissertation von Christian Burger (2019) wurden einige der hier beschriebenen Stämme genutzt, die *sldAB*- und *mgdh*-Gene Plasmid-basiert oder chromosomal in Multideletionsstämmen von *G. oxydans* 621H exprimierten. Aufbauend darauf sollten geeignete Fermentationsprozesse etabliert werden, die ein *upscale* der 5-Keto-D-Gluconat-Produktion in industrielle Maßstäbe ermöglichen sollten. Kritische Parameter, wie der pH-Wert und die Sauerstoffeintragsrate konnten hier im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen kontrolliert und an den Prozess angepasst werden. Die höchsten Produktausbeuten und zellspezifische Produktbildungsraten wurden mit dem Stamm BP.8  $\Delta madh::mgdh1_{3504}$  erreicht, der neben der nativen *sldAB*-Gene die mGDH1\_3504 im Locus der membranständigen Alkohol Dehydrogenase exprimierte. Die maximale Konzentration lag mit diesem Stamm bei 115 g L<sup>-1</sup> 5-Keto-D-Gluconat und damit deutlich unter der von Yuan et al. (2016a) letztlich erzielten 5-Keto-D-Gluconat-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der entscheidende limitierende Faktor in der Produktion von 5-Keto-D-Gluconat aus D-Glucose mit *G. oxydans* in der Oxidation von D-Gluconat und damit in der Aktivität der Polyol Dehydrogenase lag. Sowohl in Ganzzell-DCPIP-Assays als auch in Biotransformation betrug die Aktivität der Polyol Dehydrogenase gegenüber D-Gluconat nur einen Bruchteil der Aktivität der membranständigen Glucose Dehydrogenase gegenüber D-Glucose (Kapitel 3.2, Kapitel 3.4.2 und Kapitel 3.4.3).

## 4.5 Screening-Verfahren für den spezifischen Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat

In Versuchen zur Oxidation von D-Gluconat mit Polyol Dehydrogenasen in Kapitel 3.4.2 und 3.4.3 wurde in der vorliegenden Arbeit nur eine sehr geringe Aktivität der Polyol Dehydrogenasen und eine niedrige Bildungsrate von 5-Keto-D-Gluconat gemessen. Um neue effizientere Enzyme zu finden musste ein Verfahren für den Nachweis von 5-Keto-D-Gluconat entwickelt werden, das in kurzer Zeit ein Screening in einem hohen Durchsatz und auch die Unterscheidung zwischen verschiedenen Gluconat-Derivaten ermöglichte. Dazu sollte ein Nachweis der Carbonyl-Gruppe am C5-Atom von 5-Keto-D-Gluconat dienen. Es sind einige spezifische Nachweisreaktionen für Ketone beispielsweise mit o-Nitro-Benzaldehyd bekannt, mit dem ein Keton in Gegenwart von Natronlauge zu einem indigo-analogen Farbstoff reagiert, oder Ketone in einer Kondensationsreaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gefällt werden (G. R. A. Johnson und G. Scholes 1954; Criegee et al. 2014). Jedoch wäre damit ein Screening von Wildtypstämmen auf ihre Fähigkeit 5-Keto-D-Gluconat zu bilden nicht möglich gewesen, da durch diese Nachweisreaktionen nicht zwischen 2- und 5-Keto-D-Gluconat unterschieden werden kann, jedoch ein Großteil der Essigsäurebakterien zeitgleich 2- und 5-Keto-D-Gluconat produziert (García-García et al. 2017). Eine Alternative bot der Seliwanoff-Test, durch den Ketohexosen spezifisch von Aldohexosen durch die Fähigkeit der Bildung einer Furanose-Form unterschieden werden (Seliwanoff 1887). Der Reaktionsmechanismus des Seliwanoff-Tests mit Fructose ist in Abbildung 4-1 (A) dargestellt. Der Fructose in der Furanose-Form wird in einer saurehaltigen Lösung zunächst Wasser entzogen und 5-Hydroxymethylfurfural gebildet. Das 5-Hydroxymethylfurfural reagiert anschließend in einer Kondensationsreaktion mit Resorcin-Molekülen, wobei ein roter Farbstoff entsteht. Die Reaktion mit Aldohexosen wie D-Glucose liefert dagegen ein negatives Ergebnis oder eine nur sehr langsame Reaktion mit einer leichten roten Verfärbung, da bei dieser die Ausbildung einer Glucopyranose gegenüber einer Glucofuranose durch eine geringere Ringspannung deutlich begünstigt ist. Durch die Position der Carbonylgruppe am C5-Atom in 5-Keto-D-Gluconat war auch hier die Bildung einer Furanose-Form denkbar, die durch Dehydratisierung zu einem Furfural-Derivat umgesetzt wird und mit Resorcin zu einem farbigen Endprodukt reagiert. Für 5-Keto-D-Gluconat wurde daher ein zu Fructose ähnlicher Reaktionsmechanismus angenommen (Abbildung 4-1 B). Bei 2-Keto-D-Gluconat sollte dagegen aufgrund der Position der Keto-Gruppe am C2-Atom keine Furanose-Form gebildet werden, weshalb bei Durchführung der Reaktion mit 2-Keto-D-Gluconat ein negatives Ergebnis zu erwarten war.

Erste Tests mit Reinsubstanzen an D-Gluconat, 2-Keto-D-Gluconat und 5-Keto-D-Gluconat bestätigten diese Annahmen (Abbildung 3-20). Zwar färbte sich die Lösung mit 5-Keto-D-Gluconat gelb und nicht wie bei Fructose rot, jedoch war eine Korrelation der Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat mit der Absorption bei 404 nm möglich (Abbildung 3-21, links). Auch die zusätzliche Absorption, die durch Metabolite in bewachsenem Vollmedium verursacht wurde, konnte durch Berechnung der Differenz der



**Abbildung 4-1.** Ablauf des Seliwanoff-Tests mit D-Fructose und hypothetischer Reaktionsmechanismus des Tests mit 5-Keto-D-Gluconat. A: Bildung des 5-Hydroxymethylfurfurals aus D-Fructofuranose durch Dehydratisierung, das nachfolgend mit Resorcin und einem Oxidationsmittel in einer Kondensationsreaktion zu einem roten Farbstoff reagiert. B: 5-Keto-D-Gluconat mit möglichem Reaktionsmechanismus im Seliwanoff-Test über eine Furanose-Form, die durch Dehydrierung zu einem Furfural-Derivat umgesetzt wird und anschließend mit Resorcin reagiert.

Absorptionen bei 404 nm und 480 nm korrigiert werden, ohne die Genauigkeit der Quantifizierung der 5-Keto-D-Gluconat-Produktion zu beeinflussen (Abbildung 3-21, rechts). Für D-Gluconat und 2-Keto-D-Gluconat wurde keine Farbreaktion beobachtet (Abbildung 3-20). Durch Normierung der  $OD_{600}$  konnte die Ausbeute an 5-Keto-D-Gluconat zwischen den getesteten Stämmen aus einer ungerichteten Mutagenese und Essigsäurebakterien der lehrstuhl internen Stammsammlung verglichen werden (Tabelle 3-17 und Abbildung 3-29). Die Validität der Messung der 5-Keto-D-Gluconat-Konzentration wurde zusätzlich durch Vergleich des modifizierten Seliwanoff-Tests mit einer HPLC-Analyse von Proben aus Biotransformationen bestätigt (Abbildung 3-28). Da sowohl die Anzucht der Stämme als auch die Durchführung der Biotransformation und des Tests in Mikrotiterplatten erfolgte, wurde ein Screening verschiedener Stämme im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht. Außerdem eignete sich der modifizierte Seliwanoff-Test für den spezifischen Nachweis weiterer Ketoheptosen wie den kalorienarmen Süßstoff D-Tagatose (Abbildung 3-22), die durch Essigsäurebakterien hergestellt werden können und industrielle Relevanz besitzen (Manzoni et al. 2001; Raspor und Goranovic 2008). Der modifizierte Seliwanoff-Test kann daher verwendet werden, um in kurzer Zeit eine Vielzahl potenziell geeigneter Enzyme zur Produktion dieser Ketoheptosen zu identifizieren.

## 4.6 Optimierung der Gluconat-Oxidation durch Polyol Dehydrogenasen

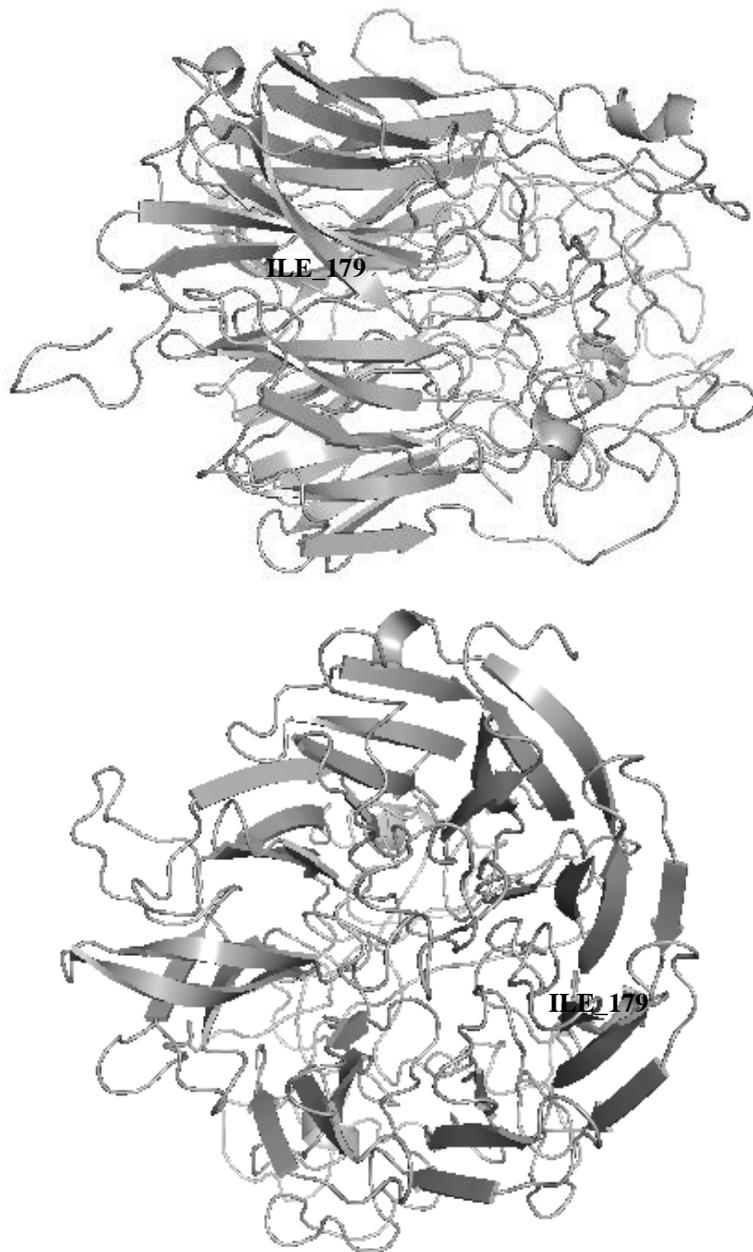
Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass die Effizienz der Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat im Gegensatz zu anderen Substraten von Polyol Dehydrogenasen gering war. Salusjärvi et al. (2004) bestimmten die Aktivitäten der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* DSM 3503 relativ zu deren Aktivität gegenüber Sorbitol. Dabei betrug die Aktivität gegenüber D-Mannitol und *meso*-Erythritol 74 % bzw. 143 %, gegenüber D-Gluconat jedoch nur 8 % bezogen auf deren Aktivität gegenüber Sorbitol (Salusjärvi et al. 2004). Auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Polyol-Dehydrogenasen wurden nur geringe Aktivitäten gegenüber D-Gluconat gemessen (Kapitel 3.2.1 und 3.4.2). Die Überexpression der Polyol Dehydrogenase resultierte in anderen Studien ebenfalls in nur einer geringen Steigerung der oxidativen Aktivität. So wurde gezeigt, dass durch Überexpression der Polyol Dehydrogenase in *G. oxydans* 621H zwar die Menge an RNA-Transkript um ein Vielfaches erhöht wurde, zeitgleich aber die Aktivität und die Ausbeute an 5-Keto-D-Gluconat im Vergleich zum parentalen Stamm nur um jeweils 60 % gesteigert wurde (Merfort et al. 2006b). Auch durch den Einsatz des TufB-Promotors zur Überexpression der *sldAB*-Gene wurde die Aktivität der Polyol Dehydrogenase nur um das 1,7-Fache gesteigert (Merfort et al. 2006a). Zwar wurde auch in dieser Arbeit eine Steigerung der Gluconat-Oxidation durch Überexpression und Verwendung von Multideletionsstämmen erreicht (Kapitel 3.4.2 und 3.4.3), dennoch lag die Effizienz der Gluconat-Oxidation deutlich unter der Effizienz der Oxidation von *meso*-Erythritol, die ebenfalls durch Polyol Dehydrogenasen katalysiert und in dieser Arbeit untersucht wurde (Kapitel 3.3.1). Es wurde daher vermutet, dass die geringe Oxidation des D-Gluconats durch die Polyol Dehydrogenase mit einer weiteren Steigerung der Expressionsraten nicht maßgeblich verbessert werden konnte. Um die Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat deutlich zu erhöhen, war der Einsatz eines effektiveren Enzyms mit einer höheren Affinität zu D-Gluconat notwendig. Daher sollte ein Enzym mit einer höheren Aktivität gegenüber D-Gluconat gefunden werden. Dazu wurden verschiedene Mutagenese-Strategien eingesetzt und die erhaltenen Varianten, sowie die lehrstuhlinterne Stammsammlung an Essigsäurebakterien durch Anwendung des modifizierten Seliwanoff-Tests getestet.

### 4.6.1 Gerichtete und ungerichtete Mutagenese mit Polyol Dehydrogenasen

In früheren Studien wurde bereits belegt, dass das Substratspektrum von PQQ-abhängigen Dehydrogenasen schon durch die Substitution einzelner Aminosäuren entscheidend beeinflusst werden kann (Cleton-Jansen et al. 1991; Igarashi et al. 1999). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Polyol Dehydrogenasen SldAB\_621H und SldAB1\_3504 wurde daher die Aminosäuresequenz der SldAB1\_3504 in der katalytischen Untereinheit (SldA) an Position 45 und 179 gezielt verändert und schrittweise in die Aminosäuresequenz der SldAB\_621H überführt, um durch Expression der veränderten Polyol Dehydrogenasen im Multideletionsstamm BP.9 die Auswirkungen einzelner

Mutationen auf das Substratspektrum und die Aktivität gegenüber D-Gluconat genauer zu untersuchen (Kapitel 3.6.1.1). Zusätzlich wurde die Aminosäure 179 in SldAB1\_3504 nochmals verändert und weitere Aminosäuren an dieser Position getestet. Es wurde gezeigt, dass die beiden Mutationen p.Ala45Gly und p.Leu179Ile in SldAB1\_3504, in denen sich die SldAB\_621H und SldAB1\_3504 unterscheiden, die Oxidationsaktivität der SldAB\_621H vollständig wiederherstellten. Die Veränderung der Aminosäuren an diesen Positionen war daher ursächlich für das verringerte Oxidationspotenzial der SldAB1\_3504. Jedoch hatten auch die einzelnen Mutationen gravierende Auswirkungen auf das Substratspektrum. Bei einigen getesteten Substraten reichte eine der beiden Mutationen, um die Oxidationsaktivität der Polyol Dehydrogenase SldAB\_621H gegenüber einzelner Substrate zu erreichen (Abbildung 3-24) oder die Aktivität der nativen Polyol Dehydrogenasen sogar zu überschreiten (Abbildung 3-25). Auch die weiteren Mutationen p.Leu179Val (Mutation 3) und p.Leu179Gly (Mutation 4) in BP.9 pADH-sldAB\_Mut3 bzw. BP.9 pADH-sldAB\_Mut4 änderten das Substratspektrum im Vergleich zu BP.9 pADH-sldAB\_Mut2, jedoch wurde hier nur eine Verschlechterung der Aktivität gegenüber einzelner Substrate beobachtet. In früheren Studien konnte bereits die Abhängigkeit der Aktivität von membranständigen Glucose Dehydrogenasen von einzelnen Aminosäure-Substitutionen gezeigt werden. Cleton-Jansen et al. (1991) beschrieben, dass die Fähigkeit, das Disaccharid Maltose zu oxidieren, durch eine zufällige Mutation im *mgdh*-Gen ausgelöst wurde. Auch Igarashi et al. (1999) untersuchten die Aktivität einer PQQ-abhängigen Glucose Dehydrogenase aus *A. calcoaceticus* LMD79.41 und zeigten, dass sich der  $K_m$ -Wert und das Substratspektrum der PQQ-abhängigen Glucose Dehydrogenase durch einzelne Mutationen erheblich verändern ließ.

Ein Modell der katalytischen Untereinheit SldA aus *G. oxydans* 621H, dargestellt in Abbildung 4-2, konnte durch Homologiemodellierung mit dem RaptorX-Webserver aus der Aminosäuresequenz des Enzyms erstellt werden (Kapitel 2.5.3). Das Modell wurde mit Kristallstrukturen von Alkohol Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* HK5 (1KV9 und 1YIQ) und der Alkohol Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* (1KB0) als Template mit einem P-Value von  $7.18 \cdot 10^{-20}$  berechnet. In Abbildung 4-2 ist zusätzlich die Lage des Isoleucins an Position 179 im Modell gezeigt, dass sich in einem der  $\beta$ -Faltblätter befindet. Für die ersten ca. 100 Aminosäuren der SldA\_621H wurde keine genaue Sekundärstruktur vorhergesagt. Daher ließ sich aufgrund des erhaltenen Modells keine Aussage über die genaue Lage des Glycins an Position 45 im Protein treffen. Da sich die Bindestellen des PQQ in der Mitte der Alkohol Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* HK5 (1KV9 und 1YIQ) und der Alkohol Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* (1KB0) hinter den  $\beta$ -Faltblättern befinden, ist es denkbar, dass sich auch dort das katalytische Zentrum der Polyol Dehydrogenase findet. Die  $\beta$ -Faltblätter könnten daher auch bei dem erstellten Homologiemodell der Polyol Dehydrogenase SldAB\_621H den Eingang zur Bindetasche bilden. Ein Austausch von Aminosäuren in diesen  $\beta$ -Faltblättern könnte zu sterischen Hinderungen und damit zu einer leichten Verschiebung der  $\beta$ -Faltblätter führen. Der Austausch des Leucins an Position 179 (Mutation 2), dass sich in einem  $\beta$ -Faltblatt von SldA1\_3504 befindet, war



**Abbildung 4-2.** Modell der katalytischen Untereinheit der Polyol Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H von der Seite (oben) und von unten (unten). Das Modell wurde durch Homologiemodellierung mithilfe des RaptorX Webservers berechnet. Als Template dienten Kristallstrukturen von Alkohol Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* HK5 (1KV9 und 1YIQ) und der Alkohol Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* (1KB0) aus der Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Die Darstellung erfolgte mit dem Programm PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

ausreichend, um eine Aktivität der Polyol Dehydrogenase gegenüber D-Gluconat zu erreichen. Die Veränderung der Aminosäure an dieser Position könnte die Lage der  $\beta$ -Faltblätter daher so verschoben haben, dass eine Bindung des D-Gluconats in der Bindetasche und folglich eine Oxidation zu 5-Keto-D-Gluconat ermöglicht wurde.

Aufgrund der gezeigten Variabilität des Substratspektrums von Polyol Dehydrogenasen durch einzelne Mutationen wurde eine ungerichtete Mutagenese der *sldAB*-Gene aus *G. oxydans* 621H mittels Error Prone PCR etabliert. Die Error Prone PCR lieferte je nach Bedingung zwischen 3 und 16 veränderte Basen der DNA-Sequenz (Tabelle 3-16). Mit der Annahme, dass keine stillen Mutationen auftraten und die mutierten Basen weit genug auseinander lagen, ergaben sich daraus ebenfalls durchschnittlich 3 bis 16 veränderte Aminosäuren in SldAB\_621H. Jedoch wurden nicht alle Nukleotide gleichmäßig

ausgetauscht, weshalb durch die Error Prone PCR nicht alle Varianten an möglichen Mutationen erreicht werden könnten. Daher sollten in folgenden Arbeiten auch andere Mutagenese-Verfahren getestet werden, um eine gleichmäßigere Verteilung der Mutationen zu erreichen. Geeignet wären Methoden wie die PCR-basierte Methode StEP (*staggered extension process*), die auf Gene-Shuffling basieren (Zhao et al. 1998). Hierbei werden konservierte Bereiche der Proteine nicht verändert, sondern nur variable Bereiche der Aminosäuresequenz zwischen homologen Proteinen ausgetauscht. Die in der vorliegenden Arbeit transformierten *E. coli*-Kolonien mit *sldAB*-Varianten aus Error Prone PCR-Ansätzen in pMM3b wurden zu Chargen zusammengefasst und im Hochdurchsatz in den Multideletionsstamm BP.9 konjugiert. Durch den modifizierten Seliwanoff-Test, wurden schließlich gezielt Varianten identifiziert, die hohe Mengen an 5-Keto-D-Gluconat produzierten. Es konnten einige Stämme mit einer zunächst höheren Ausbeute an 5-Keto-D-Gluconat als die wildtypische SldAB\_621H gefunden werden (Tabelle 3-17). Die Steigerung der 5-Keto-D-Gluconat-Produktion konnte jedoch nach weiteren Biotransformationen und Analysen mittels modifizierten Seliwanoff-Test und HPLC nicht statistisch signifikant nachgewiesen werden (Abbildung 3-28). Auch eine Sequenzierung der *sldAB*-Gene der Variante P3F6 lieferte keine veränderten Nukleotide in der DNA-Sequenz. Es ist denkbar, dass durch die Chargenbildung der *E. coli*-Stämme auch BP.9-Kolonien mit verschiedenen SldAB\_621H-Varianten entstanden und die DNA der gesuchten mutierten Variante der SldAB\_621H folglich nicht aus dieser gemischten Kultur isoliert wurde. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass durch weitere Screenings Stämme mit Polyol Dehydrogenasen identifiziert und isoliert werden könnten, die ein Vielfaches der Aktivität gegenüber D-Gluconat aufweisen als SldAB\_621H.

#### **4.6.2 5-Ketogluconat-Produktion der Stammsammlung im modifizierten Seliwanoff-Test**

Eine weitere Anwendung des modifizierten Seliwanoff-Tests wurde durch das Screening der lehrstuhlinterne Stammsammlung an Essigsäurebakterien gezeigt (Kapitel 3.6.2). Da durch andere enzymatische Assays wie der Ganzzell-DCPIP-Assays die 5-Ketogluconat-Produktion nicht direkt verfolgt werden konnte und die Aktivität der Polyol Dehydrogenase durch die Aktivität der Gluconat-2-Dehydrogenase verzerrt wurde, musste eine andere Strategie zur Bestimmung der 5-Ketogluconat-Produktion von Essigsäurebakterien gefunden werden. Auch eine Quantifizierung mittels HPLC wäre sehr arbeits- und zeitaufwendig gewesen und war deshalb nicht für ein Screening geeignet. Eine Kombination von Zellanzucht und Biotransformationen mit D-Gluconat im Mikrotiterplatten-Maßstab mit einer direkt folgenden Messung der 5-Keto-D-Gluconat-Konzentration durch den modifizierten Seliwanoff-Tests bot eine schnelle und selektive Messmethode, um Stämme bzw. Enzyme für die Oxidation von D-Gluconat zu 5-Keto-D-Gluconat zu finden. Mit diesem Verfahren war es möglich 44 Essigsäurebakterien auf ihre Produktion von 5-Keto-D-Gluconat hin zu testen (Abbildung 3-29). Die Replikate der einzelnen Stämme zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und

demonstrierten damit noch einmal die Validität und Reliabilität der entwickelten Nachweismethode (Daten nicht gezeigt). Vertreter der *Gluconobacter*-Gruppe bildeten am meisten 5-Keto-D-Gluconat mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 20 %. *G. oxydans* 621H erreichte hier bezogen auf eine  $OD_{600}=0,4$  sogar eine Ausbeute von  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat (Abbildung 3-29), obwohl dieser in vorherigen Experimenten im modifizierten Seliwanoff-Test bei einer identischen Zelldichte nur etwa  $1 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat produzierte (Abbildung 3-28). Der Unterschied lag hier im Nährmedium, das zur Zellanzucht von *G. oxydans* 621H verwendet wurde. Bei Versuchen mit Wildtypstämmen der Stammsammlung in Kapitel 3.1 wurde zur Anzucht der Zellen EPmod-Medium mit D-Mannitol und bei früheren Versuchen in Kapitel 3.6.1.2 Vollmedium mit D-Fructose als Kohlenstoff-Quelle verwendet. D-Fructose im Vollmedium kann direkt von *G. oxydans* aufgenommen und abgebaut werden (Kostner 2013). D-Mannitol in EPmod-Medium muss dagegen zunächst von der Polyol Dehydrogenase zu D-Fructose oxidiert werden, um zur Bildung von Biomasse genutzt werden zu können (Voss et al. 2010; Hanke et al. 2012). Die Expression der Polyol Dehydrogenase könnte daher im EPmod-Medium hochreguliert worden sein, wodurch auch die anschließende Oxidation von D-Gluconat schneller ablief. Voss et al. (2010) untersuchten das Wachstum von *G. oxydans* DSM 7145 und die Aktivität der Polyol Dehydrogenase auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und konnten keine Regulation der Expression für die Polyol Dehydrogenase feststellen. Ob dies auch für *G. oxydans* 621H zutrifft oder andere Komponenten des EPmod-Mediums für den Anstieg der Produktion an 5-Keto-D-Gluconat verantwortlich waren, müssten in weiteren Studien untersucht werden. *A. pasteurianus* B803 erreichte eine der höchsten Konzentrationen an 5-Keto-D-Gluconat und zeigte auch schon in Ganzzell-DCPIP Assays von allen *Acetobacter*-Stämmen die höchste Aktivität gegenüber D-Gluconat (Tabelle 3-1). Ein großer Teil dieser Aktivität ist daher vermutlich einer membranständigen Polyol Dehydrogenase zuzuschreiben. Mit *N. chiangmaiensis* NBRC 101099 wurde dagegen in Ganzzell-DCPIP Assays die höchste Aktivität gegenüber D-Gluconat gemessen, gehörte aber mit einer Ausbeute von  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  5-Keto-D-Gluconat nicht zu den Stämmen mit hoher Polyol Dehydrogenase-Aktivität (Tabelle 3-1 und Abbildung 3-29). In diesem Stamm wurde D-Gluconat folglich durch eine sehr hohe Aktivität der Gluconat-2-Dehydrogenase zum Großteil zu 2-Keto-D-Gluconat oxidiert. Dies verdeutlicht noch einmal die Wichtigkeit eines spezifischen Nachweises von 5-Keto-D-Gluconat, um die Aktivität von membranständigen Polyol Dehydrogenasen gegenüber D-Gluconat richtig einschätzen zu können. Die höchste Konzentration an 5-Keto-D-Gluconat wurde mit *G. japonicus* LMG 1417 gemessen (Abbildung 3-29) und lag etwa 50 % über der Ausbeute von *G. oxydans* 621H. Die Polyol Dehydrogenase aus *G. japonicus* LMG 1417 wäre damit ein vielversprechender Kandidat, um eine effiziente Katalyse der zweiten Teilreaktion für die Oxidation von D-Glucose zu 5-Keto-D-Gluconat im Multideletionsstamm *G. oxydans* 621H BP.9 zu gewährleisten.

## 4.7 Oxidation von Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen

Seit Jahren sind auftretende Resistenzen humanpathogener Bakterien gegen viele Antibiotika und multiresistente Erreger problematisch und daher die Entwicklung neuer chemischer Strukturen mit antibiotischer Wirkung für die Behandlung von Infektionen essenziell. In vielen Studien und auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass membranständige Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien eine Vielzahl an verschiedenen Substraten oxidieren. Da auch Antibiotika verschiedener Gruppen unterschiedlichste chemische Strukturen aufweisen, war eine Oxidation bestimmter Strukturen in Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen denkbar. Durch diese Oxidationen wären gegebenenfalls Modifikationen und Weiterentwicklungen der bestehenden chemischen Strukturen möglich, um neue antibiotische Wirkstoffe zu entwickeln. Die unvollständige Oxidation verschiedenster Substrate durch membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien wurde bereits vielfach untersucht und neue Substrate von membranständigen Dehydrogenasen beschrieben (Hoshino et al. 2003; Kawai et al. 2013; Kersters et al. 1965; Ameyama et al. 1981a, 1981b, 1985; Peters et al. 2013; Peters et al. 2017; Yakushi et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Oxidation von Antibiotika durch membranständige Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien gezeigt (Kapitel 3.7.2). Untersucht wurde dabei die Oxidation von sechs Antibiotika durch 42 Stämme der lehrstuhlinterne Stammsammlung an Essigsäurebakterien. Für fünf der sechs Antibiotika wurde eine Oxidation in Ganzzell-DCPIP-Assays durch verschiedene Stämme mit Aktivitäten bis zu 298  $\mu$ Units (*A. pasteurianus* LMG 1513) nachgewiesen (Tabelle 3-18). Nur mit Tetrazyklin als Substrat wurde keine eindeutige Aktivität gemessen. Das Substratspektrum war wie schon zuvor stark von den einzelnen Stämmen abhängig. Außerdem wurde für keine der getesteten *Asaia*-Stämme eine Oxidation der Antibiotika beobachtet. Um die verantwortlichen membranständigen Dehydrogenasen für die Antibiotika-Oxidation zu identifizieren, wurden Ganzzell-DCPIP-Assays mit BP.9-Expressionsstämmen durchgeführt, die verschiedene membranständige Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 exprimierten. *G. albidus* TMW2.1191 oxidierte in Ganzzell-DCPIP-Assays die beiden Aminoglykosid-Antibiotika Gentamicin und Kanamycin und das Polypeptid-Antibiotikum Polymyxin B (Tabelle 3-18). Auch in BP.9-Expressionsstämmen wurden diese Oxidationen mit geringeren Aktivitäten mit der mFuDH\_Gal und mSDH\_Gal nachgewiesen (Abbildung 3-30). Da in *G. oxydans* 621H in den vorangegangenen Ganzzell-DCPIP-Assays keine Aktivität gegenüber den getesteten Antibiotika gezeigt hatte (Tabelle 3-18), war die Aktivität der BP.9-Expressionsstämme gegenüber Gentamicin, Kanamycin und Polymyxin B eindeutig der Aktivität der exprimierten membranständigen Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 zuzuordnen. Die Aktivität von BP.9 pADH-mSDH\_Gal bzw. BP.9 pADH-mFuDH\_Gal gegenüber Gentamicin, Kanamycin und Polymyxin B betrug jedoch nur 20 – 40 % der Aktivität von *G. albidus* TMW2.1191. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch andere unbekannte Enzyme direkt oder indirekt an der Oxidation der Antibiotika in *G. albidus* TMW2.1191 beteiligt waren.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Oxidation von Antibiotika auf deren Wirksamkeit untersucht (Kapitel 3.7.2). Für *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 wurden die minimalen Hemmkonzentrationen in Flüssigkulturen und die Hemmhofgröße bei Plattendiffusionstests der getesteten Antibiotika bestimmt. Dabei wurden Antibiotikallösungen verwendet, die aus Biotransformationen mit Essigsäurebakterien stammen. Dabei ergab sich für *E. coli* K12 und *S. aureus* DSM 20232 eine Abnahme der Hemmhofgröße mit Gentamicin bei Zunahme der Inkubationsdauer des Antibiotikums in Biotransformationen mit *G. oxydans* ATCC 9937 und *K. hansenii* LMG 1527 (Abbildung 3-32). Einer der bisher bekannten Mechanismen zur Vermittlung einer Resistenz gegen Gentamicin verläuft durch die Acetylierung von Aminogruppen innerhalb des Gentamicins durch eine Aminoglykosid N-Acetyltransferase, wodurch eine Bindung des Antibiotikums an die 30S-Untereinheit der Ribosomen verhindert wird (Chevereau et al. 1974). Ein BLASTp mit der „AAC(3) family N-acetyltransferase“ (WP\_011252214.1) aus *G. oxydans* 621H, welche in der Dissertation von Hoffmeister (2006) als Aminoglycoside N3-acetyltransferase annotiert wurde, zeigte homologe Proteine in Vertretern der Genera *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Kozakia* und *Neoasaia*. Daher kann die geringere Wirksamkeit des Gentamicins nach der Biotransformation mit *G. oxydans* ATCC 9937 ebenfalls durch eine Aminoglykosid N-Acetyltransferase vermittelt worden sein. Jedoch konnten für die Gattungen *Gluconacetobacter* und *Komagataeibacter* keine ähnlichen Proteine im BLASTp gefunden werden, weshalb ist vermutlich auch in *K. hansenii* LMG 1527 keine Aminoglykosid N-Acetyltransferase codiert ist. Die sinkende Wirksamkeit des Gentamicins mit fortlaufender Biotransformation ist für diesen Stamm daher wahrscheinlich auf die Aktivität membranständiger Dehydrogenasen oder auf einen anderen unbekanntem Resistenzmechanismus zurückzuführen. Eine tatsächliche Abnahme der antibiotischen Wirkung aufgrund der oxidativen Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien muss jedoch in weiteren Versuchen genauer untersucht und bestätigt werden. Dazu müsste zunächst vor allem eine quantitative Messmethode beispielsweise durch HPLC etabliert werden, um den Oxidationsgrad der eingesetzten Antibiotika in Biotransformationen und die Auswirkungen der Oxidation auf die antibiotische Wirksamkeit gegenüber *E. coli* und *S. aureus* genauer bestimmen zu können.

Für das opportunistisch humanpathogene Essigsäurebakterium *Granulibacter bethesdensis* wurden bereits Resistenzen gegen Antibiotika beschrieben, jedoch scheint Gentamicin *in vitro* und *in vivo* wirksam gegen *Granulibacter bethesdensis* zu sein (Greenberg et al. 2010). *Pseudomonas* gehört wie Essigsäurebakterien zu den Proteobakterien und viele Vertreter dieser Gattung besitzen ebenfalls verschiedene membranständige Dehydrogenasen (Matsushita et al. 1979; Matsushita et al. 1980). Zur Gattung *Pseudomonas* zählen außerdem mehrere Humanpathogene, die schwerwiegende Infektionen auslösen und viele Resistenzen gegen Antibiotika aufweisen können (Wu et al. 2015; Hwang W. und Yoon 2019; Pachori et al. 2019; Pang et al. 2019). Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zusammenhänge zwischen der oxidativen Aktivität von membranständigen Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien und der Wirksamkeit von Gentamicin wäre gegebenenfalls

auch eine genauere Untersuchung der membranständigen Dehydrogenasen aus *Pseudomonas* interessant. Ungeachtet dessen könnte die Aktivität der membranständigen Dehydrogenasen gegenüber Antibiotika als Möglichkeit genutzt werden, bereits vorhandene Antibiotika-Strukturen zu modifizieren und dadurch bereits bestehende Resistenzen von humanpathogenen Bakterien zu bekämpfen.

## 5 Literaturverzeichnis

Adachi, O.; Fujii, Y.; Ghaly, M. F.; Toyama, H.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. (2001): Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: a versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (12), S. 2755–2762. DOI: 10.1271/bbb.65.2755.

Adachi, O.; Moonmangmee, D.; Toyama, H.; Yamada, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. (2003): New developments in oxidative fermentation. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (6), S. 643–653. DOI: 10.1007/s00253-002-1155-9.

Adachi, O.; Tayama, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Ameyama, M. (1978): Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (11), S. 2045–2056. DOI: 10.1080/00021369.1978.10863306.

Adachi, O.; Tayama, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Ameyama, M. (1980): Purification and Characterization of Membrane-bound Aldehyde Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 44 (3), S. 503–515. DOI: 10.1080/00021369.1980.10863997.

Adlercreutz, P. (1989): Oxidation of *trans*- and *cis*-1,2-cyclohexanediol by *Gluconobacter oxydans*. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 30 (3), S. 257–263. DOI: 10.1007/BF00256215.

Alauzet, C.; Teyssier, C.; Jumas-Bilak, E.; Gouby, A.; Chiron, R.; Rabaud, C. et al. (2010): *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. In: *Journal of Clinical Microbiology* 48 (11), S. 3935–3942. DOI: 10.1128/JCM.00767-10.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* 215 (3), S. 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1981a): d -Glucose Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, Purification and Characterization. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 45 (4), S. 851–861. DOI: 10.1080/00021369.1981.10864633.

Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1981b): D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose. In: *Journal of Bacteriology* 145 (2), S. 814–823.

Ameyama, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O. (1985): Solubilization, Purification and Properties of Membrane-bound Glycerol Dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (4), S. 1001–1010. DOI: 10.1080/00021369.1985.10866858.

- Ano, Y.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Toyama, H.; Yakushi, T.; Matsushita, K. (2011): Selective, high conversion of D-glucose to 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (3), S. 586–589. DOI: 10.1271/bbb.100701.
- Arber, W.; Linn, S. (1969): DNA modification and restriction. In: *Annual Review of Biochemistry* 38, S. 467–500. DOI: 10.1146/annurev.bi.38.070169.002343.
- Asai, T.; Ilzuka, H.; Komagata, K. (1964): The Flagellation and Taxonomy of Genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with Reference to the Existence of Intermediate Strains. In: *Journal of General and applied Microbiology* 10 (2), S. 95–126. DOI: 10.2323/jgam.10.95.
- Bongs, J.; Hahn, D.; Schörken, U.; Sprenger, G. A.; Kragl, U.; Wandrey, C. (1997): Continuous production of erythrose using transketolase in a membrane reactor. In: *Biotechnology Letters* 19 (3), S. 213–215.
- Bories, A.; Claret, C.; Soucaille, P. (1991): Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. In: *Process Biochemistry* 26, S. 243–248.
- Boyer, H. W.; Roulland-Dussoix, D. (1969): A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. In: *Journal of Molecular Biology* 41 (3), S. 459–472.
- Buchert, J.; Viikari, L. (1988): Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, S. 375–379.
- Burger, C.; Kessler, C.; Gruber, S.; Ehrenreich, A.; Liebl, W.; Weuster-Botz, D. (2019): L-Erythrose production with a multideletion strain of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (11), S. 4393–4404. DOI: 10.1007/s00253-019-09824-w.
- Burger, Christian (2019): Ganzzellbiokatalyse mit rekombinanten *Gluconobacter oxydans* Stämmen. Dissertation. München.
- Cadwell, R. Craig; Joyce, Gerald F. (1992): Randomization of Genes by PCR Mutagenesis. In: *Genome Research* 2 (1), S. 28–33.
- Chevereau, M.; Daniels, P. J.; Davies, J.; LeGoffic, F. (1974): Aminoglycoside resistance in bacteria mediated by gentamicin acetyltransferase II, an enzyme modifying the 2'-amino group of aminoglycoside antibiotics. In: *Biochemistry* 13 (3), S. 598–603. DOI: 10.1021/bi00700a030.
- Claret, C.; Salmon, J. M.; Romieu, C.; Bories, A. (1994): Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, S. 359–365.

Cleton-Jansen, A.-M.; Dekker, S.; van der Putte, P.; Goosen, N. (1991): A single amino acid substitution changes the substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans*. In: *Molecular Genetics and Genomics* 229, S. 206–212.

Criegee, T.; Kirmse, W.; Kutter, E.; Müller, P.; Müller-Dolezal, H. (2014): Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. II, 4th Edition: General Laboratory Practice 2: Thieme. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=9iWGAwAAQBAJ>.

de Ley, J. (1961): Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. In: *Journal of general microbiology* 24, S. 31–50. DOI: 10.1099/00221287-24-1-31.

de Ley, J. (1984): The genus *Gluconobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1, S. 267–278.

de Muynck, C.; Pereira, C. S. S.; Naessens, M.; Parmentier, S.; Soetaert, W.; Vandamme, E. J. (2007): The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (3), S. 147–171. DOI: 10.1080/07388550701503584.

Deppenmeier, U.; Ehrenreich, A. (2009): Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1-2), S. 69–80. DOI: 10.1159/000142895.

Deppenmeier, U.; Hoffmeister, M.; Prust, C. (2002): Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3), S. 233–242. DOI: 10.1007/s00253-002-1114-5.

Ehrenreich, A.; Liebl, W. (2017): The Genomes of Acetic Acid Bacteria. In: H. König, G. Uden und J. Fröhlich (Hg.): *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Bd. 65. Cham: Springer International Publishing, S. 469–494.

Elfari, M.; Ha, S.-W.; Bremus, C.; Merfort, M.; Khodaverdi, V.; Herrmann, U. et al. (2005): A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (6), S. 668–674. DOI: 10.1007/s00253-004-1721-4.

Figurski, D. H.; Helinski, D. R. (1979): Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (4), S. 1648–1652. DOI: 10.1073/pnas.76.4.1648.

Finn, R. D.; Attwood, T. K.; Babbitt, P. C.; Bateman, A.; Bork, P.; Bridge, A. J. et al. (2017): InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. In: *Nucleic Acids Research* 45 (D1), D190-D199. DOI: 10.1093/nar/gkw1107.

- Finn, R. D.; Bateman, A.; Clements, J.; Coghill, P.; Eberhardt, R. Y.; Eddy, S. R. et al. (2014): Pfam: the protein families database. In: *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), D222-30. DOI: 10.1093/nar/gkt1223.
- Frank, O.; Kreissl, J. K.; Daschner, A.; Hofmann, T. (2014): Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative (1)h NMR spectroscopy. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (12), S. 2506–2515. DOI: 10.1021/jf405529b.
- G. R. A. Johnson; G. Scholes (1954): Micro-determination of acetaldehyde as its 2:4-dinitrophenylhydrazone. In: *Analyst* 79 (937), S. 217–219. DOI: 10.1039/AN9547900217.
- Gao, L.; Hu, Y.; Liu, J.; Du, G.; Zhou, J.; Chen, J. (2014): Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol. In: *Metabolic Engineering* 24, S. 30–37. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.04.003.
- García-García, I.; Cañete-Rodríguez, A. M.; Santos-Dueñas, I. M.; Jiménez-Hornero, J. E.; Ehrenreich, A.; Liebl, W. et al. (2017): Biotechnologically relevant features of gluconic acid production by acetic acid bacteria. In: *Acetic acid bacteria* 6 (1), S. 7–12. DOI: 10.4081/aab.2017.6458.
- Gardy, J. L. (2003): PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. In: *Nucleic Acids Research* 31 (13), S. 3613–3617. DOI: 10.1093/nar/gkg602.
- Gätgens, C.; Degner, U.; Bringer-Meyer, S.; Herrmann, U. (2007): Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (3), S. 553–559. DOI: 10.1007/s00253-007-1003-z.
- Gawroński, J.; Gawrońska, K. (1999): Tartaric and malic acids in synthesis. A source book of building blocks, ligands, auxiliaries, and resolving agents. New York: Wiley (A Wiley-Interscience publication). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/bios/wiley042/98018545.html>.
- Ghosh, A. K.; Koltun, E. S.; Bilcer, G. (2001): Tartaric Acid and Tartrates in the Synthesis of Bioactive Molecules. In: *Synthesis* 2001 (9), S. 1281–1301. DOI: 10.1055/s-2001-15217.
- Gillis, M.; de Ley, J. (1980): Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30 (1), S. 7–27.
- Gillis, M.; Kersters, K.; Gossele, F.; Swings, J.; de Ley, J.; MacKenzie, A. R.; Bousfield, I. J. (1983): Rediscovery of Bertrand's sorbose bacterium (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*): Proposal to designate NCIB 11664 in place of NCIB 4112 (ATCC 23767) as the type strain of *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33 (1), S. 122–124.
- Goldberg, J. B.; Ohman, D. E. (1984): Cloning and Expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a Gene Involved in the Production of Alginate. In: *Journal of Bacteriology* 158 (3), S. 1115–1121.

Gray, B. E. (1945): Preparation of 2-keto gulonic acid and its salts am 04.05.1945. Anmeldenr: US59187945A. Veröffentlichungsnr: US2421611A.

Greenberg, D. E.; Porcella, S. F.; Stock, F.; Wong, A.; Conville, P. S.; Murray, P. R. et al. (2006): *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (Pt 11), S. 2609–2616. DOI: 10.1099/ijs.0.64412-0.

Greenberg, D. E.; Shoffner, A. R.; Zelazny, A. M.; Fenster, M. E.; Zarembek, K. A.; Stock, F. et al. (2010): Recurrent *Granulibacter bethesdensis* Infections and Chronic Granulomatous Disease. In: *Emerging Infectious Diseases* 16 (9), S. 1341–1348. DOI: 10.3201/eid1609.091800.

Greenfield, S.; Claus, G. W. (1972): Nonfunctional Tricarboxylic Acid Cycle and the Mechanism of Glutamate Biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. In: *Journal of Bacteriology*, S. 1295–1301.

Gruber, S. (2015): Untersuchungen zur Substratspezifität membranständiger Dehydrogenasen in Essigsäurebakterien. Master Thesis: Technische Universität München.

Guigas, G.; Weiss, M. (2016): Effects of protein crowding on membrane systems. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1858 (10), S. 2441–2450.

Gullo, M.; La China, S.; Petroni, G.; Di Gregorio, S.; Giudici, P. (2019): Exploring K2G30 Genome: A High Bacterial Cellulose Producing Strain in Glucose and Mannitol Based Media. In: *Frontiers in Microbiology* 10, S. 58. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00058.

Gullo, M.; Verzelloni, E.; Canonico, M. (2014): Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. In: *Process Biochemistry* 49 (10), S. 1571–1579. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.07.003.

Gupta, A.; Singh, V. K.; Qazi, G. N.; Kumar, A. (2001): *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3 (3), S. 445–456.

Gurtler, J. B.; Mai, T. L. (2014): Preservatives. Traditional Preservatives - Organic Acids. In: Carl A. Batt und Richard K. Robinson (Hg.): *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Cambridge: Elsevier Science, S. 119–130.

Hanke, T.; Nöh, K.; Noack, S.; Polen, T.; Bringer, S.; Sahm, H. et al. (2013): Combined fluxomics and transcriptomics analysis of glucose catabolism via a partially cyclic pentose phosphate pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (7), S. 2336–2348. DOI: 10.1128/AEM.03414-12.

Hanke, T.; Richhardt, J.; Polen, T.; Sahm, H.; Bringer, S.; Bott, M. (2012): Influence of oxygen limitation, absence of the cytochrome bc(1) complex and low pH on global gene expression in

- Gluconobacter oxydans* 621H using DNA microarray technology. In: *Journal of Biotechnology* 157 (3), S. 359–372. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.12.020.
- Herrmann, U.; Merfort, M.; Jeude, M.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (2004): Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (1), S. 86–90. DOI: 10.1007/s00253-003-1455-8.
- 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. In: *Journal of Biotechnology* 307, S. 164–174. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.11.001.
- Hoffmeister, M. (2006): Untersuchungen zur Physiologie des Essigsäurebakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H. Dissertation: Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Hölscher, T.; Görisch, H. (2006): Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Journal of Bacteriology* 188 (21), S. 7668–7676. DOI: 10.1128/JB.01009-06.
- Hölscher, T.; Schleyer, U.; Merfort, M.; Bringer-Meyer, S.; Görisch, H.; Sahm, H. (2009): Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1-2), S. 6–13. DOI: 10.1159/000142890.
- Hölscher, T.; Weinert-Sepalage, D.; Görisch, H. (2007): Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. In: *Microbiology* 153 (Pt 2), S. 499–506. DOI: 10.1099/mic.0.2006/002196-0.
- Hoshino, T.; Sugisawa, T.; Shinjoh, M.; Tomiyama, N.; Miyazaki, T. (2003): Membrane-bound d-sorbitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255—enzymatic and genetic characterization. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1647 (1-2), S. 278–288. DOI: 10.1016/S1570-9639(03)00071-2.
- Hu, Y.; Wan, H.; Li, J.; Zhou, J. (2015): Enhanced production of L-sorbose in an industrial *Gluconobacter oxydans* strain by identification of a strong promoter based on proteomics analysis. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42 (7), S. 1039–1047. DOI: 10.1007/s10295-015-1624-7.
- Hwang W.; Yoon, S. S. (2019): Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Sci Rep* 9 (1), S. 1–15. DOI: 10.1038/s41598-018-37422-9.
- Igarashi, S.; Ohtera, T.; Yoshida, H.; Witarto, A. B.; Sode, K. (1999): Construction and Characterization of Mutant Water-Soluble PQQ Glucose Dehydrogenases with Altered Km Values-Site-Directed

Mutagenesis Studies on the Putative Active Site. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, S. 820–824.

Izai, K.; Uchida, Y.; Orii, T.; Yamamoto, S.; Hashimoto, T. (1992): Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (2), S. 1027–1033.

Jermann, R.; Toumiat, M.; Imfeld, D. (2002): Development of an *in vitro* efficacy test for self-tanning formulations. In: *International Journal of Cosmetic Science* 24, S. 35–42.

Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezhuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T. L. (2008): NCBI BLAST: a better web interface. In: *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server issue), W5-9. DOI: 10.1093/nar/gkn201.

Jones, P.; Binns, D.; Chang, H.-Y.; Fraser, M.; Li, W.; McAnulla, C. et al. (2014): InterProScan 5: genome-scale protein function classification. In: *Bioinformatics* 30 (9), S. 1236–1240. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu031.

Junker, A. (2012): Untersuchung des Zentralstoffwechsels von *Gluconobacter oxydans* durch die Etablierung eines markerfreien Deletionssystems. Dissertation: Technische Universität München.

Källberg, Morten; Wang, Haipeng; Wang, Sheng; Peng, Jian; Wang, Zhiyong; Lu, Hui; Xu, Jinbo (2012): Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. In: *Nature protocols* 7 (8), S. 1511–1522. DOI: 10.1038/nprot.2012.085.

Kallnik, V.; Meyer, M.; Deppenmeier, U.; Schweiger, P. (2010): Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. In: *Journal of Biotechnology* 150 (4), S. 460–465. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.10.069.

Kataoka, N.; Matsutani, M.; Yakushi, T.; Matsushita, K. (2015): Efficient Production of 2,5-Diketo-d-Gluconate via Heterologous Expression of 2-Ketogluconate Dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 81 (10), S. 3552–3560. DOI: 10.1128/AEM.04176-14.

Kawai, S.; Goda-Tsutsumi, M.; Yakushi, T.; Kano, K.; Matsushita, K. (2013): Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome c complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5), S. 1654–1660. DOI: 10.1128/AEM.03152-12.

Kerstens, K.; Lisdiyanti, P.; Komagata, K.; Swings, J. (2006): The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer und E. Stackebrandt (Hg.): *The Prokaryotes*, Bd. 2. New York, NY: Springer New York, S. 163–200.

- Kerstens, K.; Wood, W. A.; de Ley, J. (1965): Polyol dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240 (3), S. 965–974. DOI: 10.1016/0076-6879(66)09041-4.
- Kheshgi, S.; Roberts, H. R.; Bucek, W. (1954): Studies on the Production of 5-Ketogluconic Acid by *Acetobacter suboxydans*. In: *Applied Microbiology* 2 (4), S. 183–190.
- Klasen, R.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1992): Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce tartaric acid. In: *Biotechnology and Bioengineering* 40, S. 183–186.
- Kommanee, J.; Tanasupawat, S.; Yukphan, P.; Malimas, T.; Muramatsu, Y.; Nakagawa, Y.; Yamada, Y. (2010): *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 56 (1), S. 81–87. DOI: 10.2323/jgam.56.81.
- Kostner, D. (2013): Entwicklung eines markerfreien *in frame* Deletionssystems für Acetobacteraceae. Dissertation: Technische Universität München.
- Kostner, D.; Luchterhand, B.; Junker, A.; Volland, S.; Daniel, R.; Büchs, J. et al. (2015): The consequence of an additional NADH dehydrogenase paralog on the growth of *Gluconobacter oxydans* DSM3504. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (1), S. 375–386. DOI: 10.1007/s00253-014-6069-9.
- Kostner, D.; Peters, B.; Mientus, M.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013): Importance of codB for new codA-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (18), S. 8341–8349. DOI: 10.1007/s00253-013-5164-7.
- 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. In: *Gene* 166, S. 175–176.
- Krajewski, V.; Simic, P.; Mouncey, N. J.; Bringer, S.; Sahm, H.; Bott, M. (2010): Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13), S. 4369–4376. DOI: 10.1128/AEM.03022-09.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. von; Sonnhammer, E. L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. In: *Journal of Molecular Biology* 305 (3), S. 567–580. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. In: *Molecular Biology and Evolution* 35 (6), S. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- Lapenaite, I.; Kurtinaitiene, B.; Razumiene, J.; Laurinavicius, V.; Marcinkeviciene, L.; Bachmatova, I. et al. (2005): Properties and analytical application of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase from

*Gluconobacter* sp. 33. In: *Analytica Chimica Acta* 549 (1-2), S. 140–150. DOI: 10.1016/j.aca.2005.06.025.

Levering, P. R.; Weenk, G.; Olijve, W.; Dijkhuizen, L.; Harder, W. (1988): Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621-H. In: *Archives of Microbiology* 149, S. 534–539.

Li, K.; Mao, X.; Liu, L.; Lin, J.; Sun, M.; Wei, D.; Yang, S. (2016): Overexpression of membrane-bound gluconate-2-dehydrogenase to enhance the production of 2-keto-D-gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. In: *Microbial Cell Factories* 15 (1), S. 121. DOI: 10.1186/s12934-016-0521-8.

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. In: *Systematic and applied microbiology* 40 (3), S. 123–134.

Lisdiyanti, P.; Kawasaki, H.; Widyastuti, Y.; Saono, S.; Seki, T.; Yamada, Y. et al. (2002): *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (Pt 3), S. 813–818. DOI: 10.1099/00207713-52-3-813.

Lu, L.; Wei, L.; Zhu, K.; Wei, D.; Hua, Q. (2012): Combining metabolic engineering and adaptive evolution to enhance the production of dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in a low-cost way. In: *Bioresource Technology* 117, S. 317–324. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.013.

Macauley, S.; McNeil, B.; Harvey, L. M. (2001): The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 21 (1), S. 1–25. DOI: 10.1080/20013891081665.

Malimas, T.; Yukphan, P.; Takahashi, M.; Kaneyasu, M.; Potacharoen, W.; Tanasupawat, S. et al. (2007): *Gluconobacter kondonii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 53 (5), S. 301–307.

Malimas, T.; Yukphan, P.; Takahashi, M.; Kaneyasu, M.; Potacharoen, W.; Tanasupawat, S. et al. (2008): *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (3), S. 666–671. DOI: 10.1271/bbb.70233.

Malimas, T.; Yukphan, P.; Takahashi, M.; Muramatsu, Y.; Kaneyasu, M.; Potacharoen, W. et al. (2009): *Gluconobacter japonicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (Pt 3), S. 466–471. DOI: 10.1099/ij.s.0.65740-0.

- Mamlouk, D.; Gullo, M. (2013): Acetic Acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. In: *Indian Journal of Microbiology* 53 (4), S. 377–384. DOI: 10.1007/s12088-013-0414-z.
- Manzoni, M.; Rollini, M.; Bergomi, S. (2001): Biotransformation of D-galactitol to tagatose by acetic acid bacteria. In: *Process Biochemistry* 36, S. 971–977.
- Martinussen, J.; Hammer, K. (1994): Cloning and characterization of upp, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*. In: *Journal of Bacteriology* 176 (21), S. 6457–6463. DOI: 10.1128/jb.176.21.6457-6463.1994.
- 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. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (2), S. 174–184. DOI: 10.1099/00207713-39-2-174.
- Matsushita, K.; Fujii, Y.; Ano, Y.; Toyama, H.; Shinjoh, M.; Tomiyama, N. et al. (2003): 5-Keto-D-Gluconate Production Is Catalyzed by a Quinoprotein Glycerol Dehydrogenase, Major Polyol Dehydrogenase, in *Gluconobacter* Species. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4), S. 1959–1966. DOI: 10.1128/AEM.69.4.1959-1966.2003.
- Matsushita, K.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1979): Membrane-Bound D-Gluconate Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and Structure of Cytochrome-Binding form. In: *J Biochem* 85 (5), S. 1173–1181. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132441.
- Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. (1994): Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria. In: A.H. Rose und D.W. Tempest (Hg.), Bd. 36: Academic Press (Advances in Microbial Physiology), S. 247–301.
- Matsushita, K.; Yamada, M.; Shinagawa, E.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1980): Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. In: *Journal of Bacteriology* 141 (1), S. 389–392.
- Matzerath, I.; Kläui, W.; Klasen, R.; Sahm, H. (1995): Vanadate catalysed oxidation of 5-keto-d-gluconic acid to tartaric acid: the unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. In: *Inorganica Chimica Acta* 237 (1), S. 203–205. DOI: 10.1016/0020-1693(95)04665-V.
- Merfort, M. (2006): Untersuchungen zur 5-Keto-D-Gluconat Bildung mit *Gluconobacter oxydans*. Dissertation. Jülich: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Merfort, M.; Herrmann, U.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (2006a): High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 73 (2), S. 443–451. DOI: 10.1007/s00253-006-0467-6.

- Merfort, M.; Herrmann, U.; Ha, S.-W.; Elfari, M.; Bringer-Meyer, S.; Görisch, H.; Sahm, H. (2006b): Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. In: *Biotechnology Journal* 1 (5), S. 556–563. DOI: 10.1002/biot.200600032.
- Meyer, M.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2013): Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (8), S. 3457–3466. DOI: 10.1007/s00253-012-4265-z.
- Mientus, M.; Kostner, D.; Peters, B.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2017): Characterization of membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* 621H using a new system for their functional expression. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (8), S. 3189–3200. DOI: 10.1007/s00253-016-8069-4.
- Moonmangmee, D.; Adachi, O.; Shinagawa, E.; Toyama, H.; Theeragool, G.; Lotong, N.; Matsushita, K. (2002): L-erythrulose production by oxidative fermentation is catalyzed by PQQ-containing membrane-bound dehydrogenases. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66 (2), S. 307–318.
- Moonmangmee, D.; Fujii, Y.; Toyama, H.; Theeragool, G.; Lotong, N.; Matsushita, K.; Adachi, O. (2001): Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein cyclic alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (12), S. 2763–2772.
- Motizuki, K.; Takarazuka, I.; Kanzaki, T. (1966): Method for producing 2-keto-L-gulonic acid am 1966. Anmeldenr: 3,234,105.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0), S. 263–273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- Nashy, E.; Eid, K. A. (2018): Reduction of Chrome Tanning Effluent Impact and Enhancement of Leather Properties Based on High Exhaustion of Chrome Tan. In: *Egypt. J. Chem.* 0 (0), S. 0. DOI: 10.21608/ejchem.2018.4393.1387.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Heijne, G. von (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *Protein Engineering* 10 (1), S. 1–6.
- Olijve, W.; Kok, J. J. (1979): An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. In: *Archives of Microbiology* 121, S. 291–297.
- Ostermann, S.; Richhardt, J.; Bringer, S.; Bott, M.; Wiechert, W.; Oldiges, M. (2015): (13)C Tracers for Glucose Degrading Pathway Discrimination in *Gluconobacter oxydans* 621H. In: *Metabolites* 5 (3), S. 455–474. DOI: 10.3390/metabo5030455.

- Pachori, P.; Gothwal, R.; Gandhi, P. (2019): Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. In: *Genes & Diseases* 6 (2), S. 109–119. DOI: 10.1016/j.gendis.2019.04.001.
- Pan, L.; Fang, Y.; Zhou, P.; Jin, K.; Wang, G.; Liu, Y. (2016): Strategy of oxygen transfer coefficient control on the 1-erythrulose fermentation by newly isolated *Gluconobacter kondonii*. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 24, S. 26–31. DOI: 10.1016/j.ejbt.2016.08.006.
- Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B. R.; Lin, T.-J.; Cheng, Z. (2019): Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. In: *Biotechnology Advances* 37 (1), S. 177–192. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- Peter, A. (2016): Verbesserung der Oxidation von Erythritol zu Erythrulose durch Überexpression der Polyol-Dehydrogenase von *Gluconobacter oxydans*. Master Thesis: Technische Universität München.
- Peters, B. (2013): Entwicklung eines Systems zur Expression von membranständigen Dehydrogenasen aus einem Metagenom von Essigsäurebakterien in *Gluconobacter oxydans*. Dissertation: Technische Universität München.
- Peters, B.; Mientus, M.; Kostner, D.; Daniel, R.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2017): Expression of membrane-bound dehydrogenases from a mother of vinegar metagenome in *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (21), S. 7901–7912. DOI: 10.1007/s00253-017-8479-y.
- Peters, B.; Mientus, M.; Kostner, D.; Junker, A.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2013): Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (14), S. 6397–6412. DOI: 10.1007/s00253-013-4824-y.
- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Heijne, G. von; Nielsen, H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. In: *Nature Methods* 8, 785 EP -. DOI: 10.1038/nmeth.1701.
- Pronk, J. T.; Levering, P. R.; Oijjvet, W.; van Dijken, J. P. (1989): Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. In: *Enzyme and Microbial Technology* 11, S. 160–164.
- Prust, C.; Hoffmeister, M.; Liesegang, H.; Wiezer, A.; Fricke, W. F.; Ehrenreich, A. et al. (2005): Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. In: *Nature Biotechnology* 23 (2), S. 195–200. DOI: 10.1038/nbt1062.
- Raspor, P.; Goranovic, D. (2008): Biotechnological applications of acetic acid bacteria. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (2), S. 101–124. DOI: 10.1080/07388550802046749.

- Rauch, B.; Pahlke, J.; Schweiger, P.; Deppenmeier, U. (2010): Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (3), S. 711–718. DOI: 10.1007/s00253-010-2779-9.
- Reichstein, T.; Grüssner, A. (1934): Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). In: *Helvetica Chimica Acta* 17, S. 160–164.
- Saichana, N.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Frébort, I.; Frebortova, J. (2015): Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. In: *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2), S. 1260–1271. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.001.
- Sainz, F.; Jesús Torija, M.; Matsutani, M.; Kataoka, N.; Yakushi, T.; Matsushita, K.; Mas, A. (2016): Determination of Dehydrogenase Activities Involved in D-Glucose Oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* Strains. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 1358. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01358.
- Salusjärvi, T.; Povelainen, M.; Hvorslev, N.; Eneyskaya, E. V.; Kulminskaya, A. A.; Shabalin, K. A. et al. (2004): Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (3), S. 306–314. DOI: 10.1007/s00253-004-1594-6.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual: Vol 2. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001): Molecular Cloning. A laboratory manual: Vol 3. 3. Aufl. New York, NY: Cold spring harbor laboratory press (Volume 1).
- Sará-Páez, M.; Contreras-Zentella, M.; Gómez-Manzo, S.; González-Valdez, A. A.; Gasca-Licea, R.; Mendoza-Hernández, G. et al. (2015): Purification and characterization of the membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. In: *The Protein Journal* 34 (1), S. 48–59. DOI: 10.1007/s10930-014-9596-4.
- Saravanan, V. S.; Madhaiyan, M.; Osborne, Jabez; Thangaraju, M.; Sa, T. M. (2008): Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. In: *Microbial Ecology* 55 (1), S. 130–140. DOI: 10.1007/s00248-007-9258-6.
- Schedel, M. (2000): Regioselective Oxidation of Aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, Key Reaction in the Industrial l-Deoxynojirimycin Synthesis. In: A. Pühler, D. R. Kelly, Gerald Reed, Hans-Jürgen Rehm und P. Stadler (Hg.): *Biotechnology. Volume 8b: Biotransformations II*, Bd. 70. 2nd, completely rev. ed. Weinheim, New York: Wiley-VCH, S. 295–311.

- Schleyer, U.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (2008): An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. In: *International Journal of Food Microbiology* 125 (1), S. 91–95. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.016.
- Schmid, R.; Urlacher, V. B. (2007): Modern biooxidation. Enzymes, reactions, and applications. Weinheim: Wiley-VCH.
- Seliwanoff, T. (1887): Notiz über eine Fruchtzuckerreaction. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 20 (1), S. 181–182. DOI: 10.1002/cber.18870200144.
- Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1982): Purification and Characterization of d-Sorbitol Dehydrogenase from Membrane of *Gluconobacter suboxydans* var.  $\alpha$ . In: *Agricultural and Biological Chemistry* 46 (1), S. 135–141. DOI: 10.1080/00021369.1982.10865042.
- Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Ameyama, M. (1984): D-Gluconate Dehydrogenase, 2-Keto-D-gluconate Yielding, from *Gluconobacter dioxyaceticus*: Purification and Characterization. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 48 (6), S. 1517–1522.
- Shinjoh, M.; Tomiyama, N.; Miyazaki, T.; Hoshino, T. (2002): Main polyol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255, membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase, that needs product of upstream gene, sldB, for activity. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66 (11), S. 2314–2322.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W. et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular Systems Biology* 7, S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Sievers, M.; Swings, J. (2005): Family II: Acetobacteraceae. In: G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg und J. T. Staley (Hg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. vol 2. New York: Springer, S. 41–95.
- Silberbach, M.; Maier, B.; Zimmermann, M.; Büchs, J. (2003): Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (1), S. 92–98. DOI: 10.1007/s00253-003-1222-x.
- Soemphol, W.; Adachi, O.; Matsushita, K.; Toyama, H. (2008): Distinct Physiological Roles of Two Membrane-Bound Dehydrogenases Responsible for d-Sorbitol Oxidation in *Gluconobacter frateurii*. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (3), S. 842–850.
- Sonoyama, T.; Tani, H.; Matsuda, K.; Kageyama, B.; Tanimoto, M.; Kobayashi, K. et al. (1982): Production of 2-Keto-l-Gulonic Acid from d-Glucose by Two-Stage Fermentation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 43 (5), S. 1064–1069.

- Sugisawa, T.; Hoshino, T. (2002): Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66 (1), S. 57–64.
- Sugisawa, T.; Hoshino, T.; Masuda, S.; Nomura, S.; Setoguchi, Y.; Tazoe, M. et al. (1990): Microbial production of 2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose and D-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (5), S. 1201–1209.
- Takeshita, K.; Shimonishi, T.; Izumori, K. (1996): Production of l-psicose from allitol by *Gluconobacter frateurii* IFO 3254. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (3), S. 212–215. DOI: 10.1016/0922-338X(96)82210-0.
- Toyama, H.; Soemphol, W.; Moonmangmee, D.; Adachi, O.; Matsushita, K. (2005): Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-sorbitol dehydrogenase from thermotolerant *Gluconobacter frateurii* isolated from Thailand. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69 (6), S. 1120–1129.
- Trcek, J.; Barja, F. (2015): Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. In: *International Journal of Food Microbiology* 196, S. 137–144. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.003.
- Trcek, J.; Mira, N. P.; Jarboe, L. R. (2015): Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (15), S. 6215–6229. DOI: 10.1007/s00253-015-6762-3.
- Trcek, J.; Toyama, H.; Czuba, J.; Misiewicz, A.; Matsushita, K. (2006): Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 70 (3), S. 366–373. DOI: 10.1007/s00253-005-0073-z.
- Tronich, W.; Wykpiel, W. (1985): Verfahren zur Herstellung von 2-Hydroxy-cyclohexanon-(1). am 19.08.1985. Anmeldenr: 85110340.8. Veröffentlichungsnr: EP0173198A2.
- Vasic-Racki, D.; Bongs, J.; Schörken, U.; Sprenger, G. A.; Liese, A. (2003): Modeling of reaction kinetics for reactor selection in the case of L-erythrulose synthesis. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (5), S. 285–290. DOI: 10.1007/s00449-002-0312-y.
- Vero, L. de; Gala, E.; Gullo, M.; Solieri, L.; Landi, S.; Giudici, P. (2006): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. In: *Food Microbiology* 23 (8), S. 809–813. DOI: 10.1016/j.fm.2006.01.006.
- Vero, L. de; Giudici, P. (2008): Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. In: *International Journal of Food Microbiology* 125 (1), S. 96–101. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.029.

- Vorlop, K.-D.; Decker, C.; Rose, T.; Wilke, T.; Wach, W.; Klingenberg, M. (2009): Verfahren zur Herstellung von Erythrose. Anmeldenr: DE102008006101B4.
- Voss, J. (2009): Auswirkungen der Deletion membranständiger Dehydrogenasen auf *Gluconobacter oxydans* DSM 7145. Dissertation: Georg-August Universität Göttingen.
- Voss, J.; Ehrenreich, A.; Liebl, W. (2010): Characterization and inactivation of the membrane-bound polyol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 7145 reveals a role in meso-erythritol oxidation. In: *Microbiology* 156 (Pt 6), S. 1890–1899. DOI: 10.1099/mic.0.037598-0.
- Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J. (2009): Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. In: *Bioinformatics* 25 (9), S. 1189–1191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Weenk, G.; Olijve, W.; Harder, W. (1984): Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* (20), S. 400–405.
- Wei, L.; Yang, X.; Gao, K.; Lin, J.; Yang, S.; Hua, Qiang; Wei, D. (2010): Characterization of enzymes in the oxidation of 1,2-propanediol to D: (-)-lactic acid by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. In: *Molecular Biotechnology* 46 (1), S. 26–33. DOI: 10.1007/s12033-010-9263-8.
- Whistler, R. L.; Underkofler, L. A. (1938): The Production of l-Erythrose by the Action of *Acetobacter suboxydans* upon Erythritol. In: *Journal of the American Chemical Society* 60 (10), S. 2507–2508.
- Wu, J.; Gullo, M.; Chen, F.; Giudici, P. (2010): Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. In: *Current Microbiology* 60 (4), S. 280–286. DOI: 10.1007/s00284-009-9538-0.
- Wu, Weihui; Jin, Yongxin; Bai, Fang; Jin, Shouguang (2015): *Pseudomonas aeruginosa*. In: Yi-Wei Tang (Hg.): *Molecular medical microbiology*. Second edition. London: Academic Press, S. 753–767.
- Yakushi, T.; Matsushita, K. (2010): Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (5), S. 1257–1265. DOI: 10.1007/s00253-010-2529-z.
- Yakushi, T.; Terada, Y.; Ozaki, S.; Kataoka, N.; Akakabe, Y.; Adachi, O. et al. (2018): Aldopentoses as new substrates for the membrane-bound, pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol (polyol) dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (7), S. 3159–3171. DOI: 10.1007/s00253-018-8848-1.
- Yamada, Y. (2014): Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. In:

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 5), S. 1670–1672. DOI: 10.1099/ijs.0.054494-0.

Yamada, Y.; Hosono, R.; Lisdiyanti, P.; Widyastuti, Y.; Saono, S.; Uchimura, T.; Komagata, K. (1999): Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. In: *Journal of General and applied Microbiology* 45, S. 23–28.

Yamada, Y.; Yukphan, P.; Thi Lan Vu, H.; Muramatsu, Y.; Ochaikul, D.; Tanasupawat, S.; Nakagawa, Y. (2013): *Komagataeibacter* gen. nov. In: *List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, Validation list* (149), S. 1–5.

Yu, N. Y.; Wagner, J. R.; Laird, M. R.; Melli, G.; Rey, S.; Lo, R. et al. (2010): PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. In: *Bioinformatics* 26 (13), S. 1608–1615. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq249.

Yuan, J.; Wu, M.; Lin, J.; Yang, L. (2016a): Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. In: *BMC Biotechnology* 16 (1), S. 42. DOI: 10.1186/s12896-016-0272-y.

Yuan, J.; Wu, M.; Lin, J.; Yang, L. (2016b): Enhancement of 5-keto-d-gluconate production by a recombinant *Gluconobacter oxydans* using a dissolved oxygen control strategy. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 122 (1), S. 10–16. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.12.006.

Yukphan, P.; Malimas, T.; Muramatsu, Y.; Takahashi, M.; Kaneyasu, M.; Potacharoen, W. et al. (2009): *Ameiyamaea chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (10), S. 2156–2162. DOI: 10.1271/bbb.90070.

Yukphan, P.; Malimas, T.; Muramatsu, Y.; Takahashi, M.; Kaneyasu, M.; Tanasupawat, S. et al. (2008): *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (3), S. 672–676. DOI: 10.1271/bbb.70319.

Yukphan, P.; Malimas, T.; Potacharoen, W.; Tanasupawat, S.; Tanticharoen, M.; Yamada, Y. (2005): *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the ALPHA-Proteobacteria. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 51 (5), S. 301–311. DOI: 10.2323/jgam.51.301.

Yukphan, P.; Potacharoen, W.; Tanasupawat, S.; Tanticharoen, M.; Yamada, Y. (2004): *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (Pt 2), S. 313–316. DOI: 10.1099/ijs.0.02734-0.

Zhang, Y.; Werling, U.; Edelman, W. (2012): SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. In: *Nucleic Acids Research* 40 (8), e55. DOI: 10.1093/nar/gkr1288.

Zhao, H.; Giver, L.; Shao, Z.; Affholter, J. A.; Arnold, F. H. (1998): Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. In: *Nat Biotechnol* 16 (3), S. 258–261. DOI: 10.1038/nbt0398-258.

## 6 Anhang

**Tabelle 6-1.** *In silico* Eigenschaften der identifizierten membranständigen Dehydrogenasen

Bezeichnung	Gen- Nummer	Annotation	TMHMM	SignalP	Psortb	Pfam	Interpro
<b><i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 3504</b>							
<b>SldAB1_3504</b>	GLS_RS 04720	PQQ-binding-like propeller repeat protein	beta- 0 TMHs	Yes	Periplasmic	PF13360	IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047
	GLS_RS 04725	glycerol dehydrogenase small subunit	4 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	(keine Angabe)	(keine Angabe)
<b>SldAB2_3504</b>	GLS_RS 11885	pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase	0 TMHs	Yes	Periplasmic	PF13360	IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047
	GLS_RS 11880	hypothetical protein	4 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	(keine Angabe)	(keine Angabe)
<b>mGDH1_3504</b>	GLS_RS 01440	glucose/quininate/ shikimate family membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF01011	IPR017511, IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047, IPR001479
<b>mGDH2_3504</b>	GLS_RS 07240	membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase, glucose/quininate/ shikimate family	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF13360	IPR017511, IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047, IPR001479
<b><i>Gluconobacter albidus</i> TMW2.1191</b>							
<b>SDH_Gal</b>	A0U94_ RS04580	cytochrome c	1 TMH	Yes	Cytoplasmic Membrane	PF00034, PF13442	IPR014353, IPR009056
	A0U94_ RS04585	GMC family oxidoreductase	0 TMHs	No	Keine Angabe	PF05199	IPR023753, IPR006076, IPR007867
	A0U94_ RS04590	sorbitol dehydrogenase	0 TMHs	No	Periplasmic	PF12318	IPR024651
<b>GDH_Gal</b>	A0U94_ RS08490	glucose/quininate/ shikimate family membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF01011	IPR017511, IPR011047, IPR027295, IPR018391, IPR002372, IPR001479
<b>sekADH_Gal</b>	A0U94_ RS09810	membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase, glucose/quininate/ shikimate family	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF01011	IPR017511, IPR011047, IPR027295, IPR018391, IPR002372
<b>mFuDH_Gal</b>	A0U94_ RS10160	hypothetical protein	0 TMHs	No	(keine Angabe)	PF12318	IPR024651
	A0U94_ RS10165	cytochrome c	1 TMH	Yes	Cytoplasmic Membrane	PF00034, PF13442	IPR014353, IPR009056
	A0U94_ RS10170	GMC family oxidoreductase	0 TMHs	No	(keine Angabe)	PF00732, PF05199	IPR023753, IPR000172, IPR007867

**Fortsetzung Tabelle 6-1. In silico Eigenschaften der identifizierten membranständigen Dehydrogenasen**

Bezeichnung	Gen- Nummer	Annotation	TMHMM	SignalP	Psortb	Pfam	Interpro
<b>SldAB_Gal</b>	A0U94_ RS11860	pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenase	0 TMHs	Yes	Periplasmic	PF13360	IPR011047, IPR027295, IPR018391, IPR002372
	A0U94_ RS11865	hypothetical protein	4 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	(keine Angabe)	(keine Angabe)
<b>Komagataeibacter hansenii LMG 1524</b>							
<b>SldAB_hans</b>	GXY_ RS08335	PQQ-binding-like beta- propeller repeat protein	0 TMHs	Yes	Cytoplasmic and Outer Membrane	PF01011, PF13360	IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047, IPR027295, IPR011047
	GXY_ RS08340	hypothetical protein	4 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	(keine Angabe)	(keine Angabe)
<b>GDH_hans</b>	GXY_ RS10465	glucose/quininate/ shikimate family membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase	5 TMHs	No	Periplasmic	PF01011	IPR017511, IPR018391, IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047
<b>Komagataeibacter medellinensis LMG 1693</b>							
<b>GDH_med</b>	GLX_ RS03130	glucose/quininate/ shikimate family membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF01011	IPR017511, IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047, IPR001479
<b>Ga. diazotrophicus DSM 5601</b>							
<b>GDH_PAIS</b>	GDI_ RS15540	glucose/quininate/ shikimate family membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF01011, PF13360	IPR017511, IPR018391, IPR002372, IPR027295, IPR011047, IPR001479.
<b>X. campestris DSM 3586</b>							
<b>Gcd_XC3586</b>	XCC_ RS08225	membrane-bound PQQ- dependent dehydrogenase, glucose/quininate/ shikimate family	5 TMHs	No	Cytoplasmic Membrane	PF0101, PF13360.	IPR011047, IPR017511, IPR002372, IPR018391

**Tabelle 6-2.** Oligonukleotide für die Konstruktion von Expressionsplasmiden

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
gcd_xc3586_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGTC GACATTGCTTCGTC	Amplifikation der Gcd_XC3586
gcd_xc3586_rev	ATGATTACGCCAAGCGCGCGTTGCC GCTTACC	
GAL02ex_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGAC GAAAGATCGTCACTG	Amplifikation der SDH_Gal
GAL02ex_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCAGTGCGG AGTGTGGT	
GAL03ex_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCGTGCT GCACCAGAACAAC	Amplifikation der mGDH_Gal
GAL03ex_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCATTTCTG ATCGGGCAGG	
GAL04ex_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGTC TGCTTCACTCCAG	Amplifikation der sekADH_Gal
GAL04ex_rev	ATGATTACGCCAAGCGTAAGCGGAT GCTCAGTG	
GAL05ex_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCCTGGA CACATTATCTGATCC	Amplifikation der mFuDH_Gal
GAL05ex_neu_rev	ATGATTACGCCAAGCGCGTGCTCCG TCGTTTAG	
GDH1_1693_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGA ATACCCCTTGCGTTTCG	Amplifikation der mGDH2_3504
GDH1_1693_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCAGTTCTG GTCGGCCAG	
GDH1_3504_2_for	GAACAACAGATCCAGGAACATCATG AGCACAACATCCCGG	Amplifikation der mGDH1 _3504 zur Integration in zweiten ORF von pMM3b
GDH1_3504_2_rev	CAGGTTTCATCATGCCGTTTGTCAATTT CTGATCGGGCAAGG	
GDH1_3504_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGA GCACAACATCCCGG	Amplifikation der mGDH1_3504
GDH1_3504_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCATTTCTG ATCGGGCAAGG	
GDH1_PA15_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGA ATATTAACAAGGGTTGCGGC	Amplifikation der mGDH1_PA15
GDH1_PA15_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCAGTGGGC TTCGGGC	
GDH2_3504_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCCTGCA TTCGATCGACCAACC	Amplifikation der mGDH2_3504
GDH2_3504_rev	ATGATTACGCCAAGCGTTATTTTCA TCCAATGCAAAAAGCG	
GOX02475_exG2DH_for	CTACTGTCCGGAGAAACCTATGAGC ACAACATCCCGGC	Amplifikation der mGDH_621H, Überhang zu G2DH-Promotor

**Fortsetzung Tabelle 6-2.** Oligonukleotide für die Konstruktion von Expressionsplasmiden

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
GOX02475_rev	CAGGTTTCATCATGCCGTTTGTCAATTT CTGATCGGGCAGGG	Amplifikation der mGDH _621H, Überhang zu pMM3b
GXY_08335_08340_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGTC CGCTTTCACAGTCC	Amplifikation der SldAB_hans
GXY_08335_08340_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCAGTTCGT ATTATCCAGTGCATAG	
GXY_RS10465_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGA ATACTCCCCCACCC	Amplifikation der mGDH2_3504
GXY_RS10465_rev	ATGATTACGCCAAGCGTTATTCAGG CAGGCTGTAGG	
LpromG2DH_for	GTATTGGGCGCATGCATATCTTCTA CCGAGACTGCC	Amplifikation des verlängerten G2DH- Promotors
LpromGDH 621H_for	GTATTGGGCGCATGCATAGAAGCGG TGTCCTTATCG	Amplifikation des verlängerten mGDH- Promotors
pADH_Amp2_for pADH_Amp2_rev	CAAACGGCATGATGAACCTG CCCAGCCCGGAATACTGAAGTATGC ATGCGCCCAATAC	Amplifikation von pMM3b- Derivaten zur Insertion eines zweiten ORFs
pADHuniV1_for pADHuniV1_rev	CGCTTGGCGTAATCATGG GATCCAACCTGCTTTTTTGT	Amplifikation von pMM3b- mSldAB für den Austausch der <i>sldAB</i> -Gene mit anderen mDH-Genen
pMM3b_Amp3_rev	GATGTTCTGGATCTGTTGTTC	Amplifikation von pMM3b- Derivaten zur Insertion einer zweiten mDH
promG2DH_for promG2DH_rev	GTATTGGGCGCATGCATACCCAGCC CGGAATACTGAAG GCCGGGATGTTGTGCTCATAGGTTT CTCCGGACAGTAG	Amplifikation des G2DH- Promotors
promGDH621H_for	GTATTGGGCGCATGCATAGTCCTTC CTTTCCTCAAGTC	Amplifikation des mGDH- Promotors
PromsldAB_sldAB_for PromsldAB _sldAB_rev	GTATTGGGCGCATGCATACGTGTTA TTACACGTTTTTGTAGAAATTAT CAGGTTTCATCATGCCGTTTGTCAAGC CCTTGTGATCAGGCA	Amplifikation der SldAB _621H mit nativem Promotor
sldAB1_3504 for sldAB1_3504 rev	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGCC GAATACTTATGGCAG ATGATTACGCCAAGCGTCAGCCCTT GTGATCGG	Amplifikation der SldAB1 _3504

**Fortsetzung Tabelle 6-2.** Oligonukleotide für die Konstruktion von Expressionsplasmiden

Primer	Sequenz	Verwendung
sldAB1_3504-Mut1_for	CAATGGCAGCGGCAATTC	Primer für Mutation 1 in SldAB1_3504
sldAB1_3504-Mut1_rev	GAATTGCCGCTGCCATTGC	
sldAB1_3504-Mut2_for	ACATCATGAAGATCGACCCG	Primer für Mutation 2 in SldAB1_3504
sldAB1_3504-Mut2_rev	CGGGTCGATCTTCATGATGT	
sldAB1_3504-Mut3_for	ACATCATGAAGGTCGACCC	Primer für Mutation 3 in SldAB1_3504
sldAB1_3504-Mut3_rev	GGGTCGACCTTCATGATGT	
sldAB1_3504-Mut4_for	ACATCATGAAGGGCGACCC	Primer für Mutation 4 in SldAB1_3504
sldAB1_3504-Mut4_rev	GGGTCGCCCTTCATGATGT	
sldAB2_3504_for	ACAAAAAGGACAGTTGGATCATGTT	Amplifikation der SldAB2_3504
	CCGGTGCCTTC	
sldAB2_3504_rev	ATGATTACGCCAAGCGTCAGTTCGT TCCCTTGG	

**Tabelle 6-3.** Oligonukleotide für die Konstruktion von Insertionsplasmiden

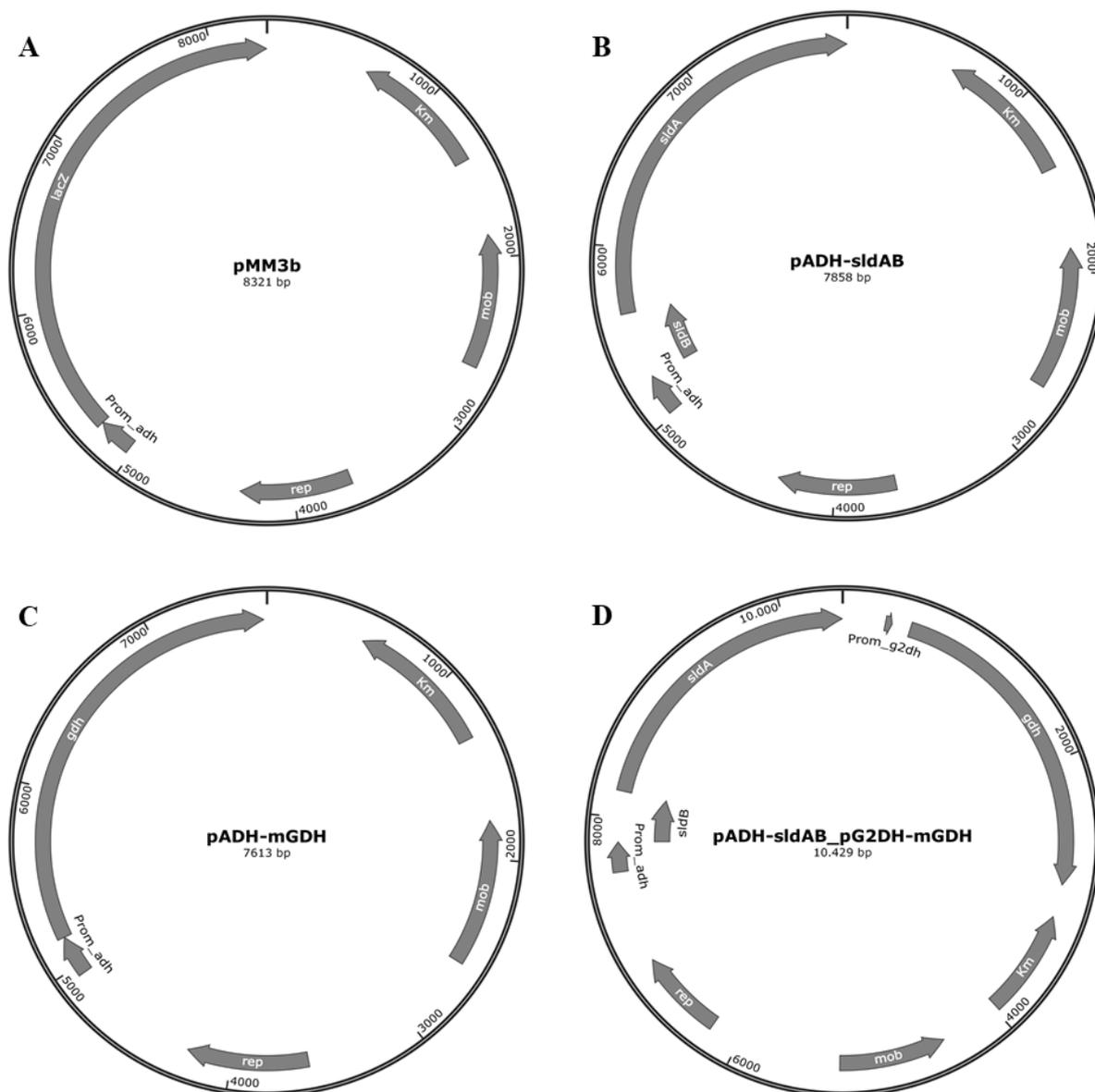
Primer	Sequenz	Verwendung
adh621H_down_rev	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTC GCGATGGGTGACAATG	Untere Flanke für die Insertion einer mDH in den mADH-Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
adh621H_up_for	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGGCC ATGAACAACCTGATCC	Obere Flanke für die Insertion einer mDH in den mADH-Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
Flanke1ins1_for	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGCCT GGGCTTTCTTCAC	Obere Flanke zur Insertion der mGDH_621H in den nativen Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
Flanke1ins1_rev	TGGCCGGGATGTTGTGCTCATG ATGTTCTCGGATCTGTTG	
Flanke2ins1_for	CGCCCTGCCCAGTATCAGAAATGA TCTGACAGGACCCTCGG	Untere Flanke zur Insertion der mGDH_621H in den nativen Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
Flanke2ins1_rev	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTAT GATCTCCAGAGCGGTG	
FlankeDown_Loc G2DH_for	CTGATCACAAGGGCTGAACGCC GCCTCAGGGCAGGA	Untere Flanke zur Insertion der SldAB_621H in den Locus der G2DH
FlankeDown_Loc G2DH_rev	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTCT TGCGGCGGATAACAACGGCTC	

Fortsetzung Tabelle 6-3. Oligonukleotide für die Konstruktion von Insertionsplasmiden

Primer	Sequenz	Verwendung
FlankeUpLocG2DH_for	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGCTC	Obere Flanke zur Insertion der SldAB_621H in den Locus der G2DH
FlankeUpLocG2DH_rev	AAGTCCCTTTTCGGTCCG CTGCCATAAGTATTCGGCATAG GTTTCTCCGGACAGTAG	
GDHins1_for	AGAACAACAGATCCAGGAACAT	Amplifikation der mGDH_621H zur Insertion in den nativen Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
GDHins1_rev	CATGAGCACAAACATCCCCG TGGCCCCGAGGGTCTGTCAGA TCATTTCTGATCGGGCAG	
ins2_adh621H_down_for	CCTTGCCCGATCAGAAATGAGC	Untere Flanke für die Insertion der mGDH1_3504 in den mADH-Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
ins2_adh621H_up_rev	GTCCCCACCCCTGTC GGCCGGGATGTTGTGCTCATGA TCCAACGTCTTTTTGT	
pKos_InsP11sldAB_for	CATTGTCACCCATCGCGACATG	Amplifikation von pKOS6b zur Insertion eines Promotors <i>upstream</i> von GOX_RS05400
pKos_InsP11sldAB_rev	GCGATAGCTAGACTGG GGATCAGTTGTTTCATGGCCACA ACATACGAGCCGGAAG	
pKos_InsSldAB2_3504_2_for	CATTGTCACCCATCGCGACATG	Amplifikation von pKOS6b für Insertionen in den mADH-Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
pKos_InsSldAB2_3504_2_rev	GCGATAGCTAGACTGG GGATCAGTTGTTTCATGGCCACA ACATACGAGCCGGAAG	
pKOS_InsSldAB621H_G2DH_for	GAGCCGTTGTATCCGCCGCAAG	Amplifikation von pKOS6b zur Insertion der SldAB_621H in den G2DH Locus
pKOS_InsSldAB621H_G2DH_rev	ACATGGCGATAGCTAGACTGG CGACCGAAAAGGGACTTGAGCA CAACATACGAGCCGGAAG	
PlasmidbackboneIns1_for	CACCGCTCTGGAGATCATACAT	Amplifikation von pKOS6b zur Insertion in den mGDH-Locus in <i>G. oxydans</i> 621H
PlasmidbackboneIns1_rev	GGCGATAGCTAGACTGG GTGAAGAAAGCCCAGGCACAAC ATACGAGCCGGAAG	
PromTufBgenom_for	GTTCTGGAGGCTTTTACCACCA	Amplifikation des TufB-Promotors aus zur Insertion <i>upstream</i> von GOX_RS05400
PromTufBgenom_rev	CTGCCGAAGGCATC GCCATAAGTATTCGGCATCGTC TTTCTCCAAAACCC	
sldAB621H_down_rev	CCAGTCTAGCTATCGCCATGTGT	Untere Flanke zur Insertion eines Promotors <i>upstream</i> von GOX_RS05400
	GCCGAGCACATGTAG	

**Fortsetzung Tabelle 6-3.** Oligonukleotide für die Konstruktion von Insertionsplasmiden

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
sldAB621H_Loc G2DH_for	CTACTGTCCGGAGAAACCTATG CCGAATACTTATGGCAG	Amplifikation der SldAB_621H zur Insertion in den G2DH Locus
sldAB621H_Loc G2DH_rev	TCCTGCCCTGAGGCGGCGTTCA GCCCTTGTGATCAG	
sldAB621H_p11down _for	GGGTTTTGGAGAAAGACGATGC CGAATACTTATGGC	Untere Flanke zur Insertion des TufB-Promotors <i>upstream</i> von GOX_RS05400
sldAB621H_p11up _rev	GATGCCTTCGGCAGTGGTGGTG AAAGCCTCCAGAAC	Obere Flanke zur Insertion des TufB- Promotors <i>upstream</i> von GOX_RS05400
sldAB621H_up_for	CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTCA TCATGCCGCTCAG	Obere Flanke zur Insertion eines Promotors <i>upstream</i> von GOX_RS05400



**Abbildung 6-1.** Plasmidkarten des Ausgangsplasmids pMM3b und pMM3b-Derivate zur Expression von membranständigen Dehydrogenasen in *G. oxydans* 621H. A) Plasmidkarte des Ausgangsplasmids pMM3b. B) Exemplarische Plasmidkarte für die Expression von Polyol Dehydrogenasen. C) Exemplarische Plasmidkarte für die Expression von membranständigen Glucose Dehydrogenasen. D) Exemplarische Plasmidkarte für die zeitgleiche Expression von membranständigen Glucose und Polyol Dehydrogenasen. Die Karten wurden mit Clone Manager 9 Professional von Scientific and Educational Software (Denver, USA) und SnapGene® Viewer Version 4.3.7 von GSL Biotech LLC (San Diego, USA) erstellt. *gdh*: Gen einer membranständigen Glucose Dehydrogenase, *Km*: Resistenzgen für Kanamycin, *mob*: Gene zur Mobilisierung des Plasmids, *rep*: Replikations-Initiations-Gen, *Prom\_adh*: Promoter der membranständigen Alkohol Dehydrogenase, *sldA* und *sldB*: große und kleine Untereinheit einer Polyol Dehydrogenase.

**Tabelle 6-4.** Getestete Substrate für die Charakterisierung der Substratspektren von membranständigen Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP Assays

Substratklasse	Substrat	
Primäre Alkohole	Methanol	
	Ethanol	
	1-Hexanol	
	2-Cyclohexylethanol	
Sekundäre Alkohole	Isopropanol	
	2,3-Butandiol	
	2,4-Pentandiol	
	2-Hexanol	
	2,5-Hexandiol	
	3-Hexanol	
Gemischte Alkohole	1,3-Propandiol	
	1,3-Butandiol	
	1,4-Butandiol	
	1,2-Pentandiol	
Zyklische Alkohole	1,3-Cyclopentandiol	
	<i>cis</i> -1,2-Cyclohexandiol	
Aldehyde	<i>meso</i> -Inositol	
	Acetaldehyd	
	Valeraldehyd	
Zuckeralkohole	D-Arabitol	
	<i>meso</i> -Erythritol	
	Galactitol	
	Glycerol	
	D-Mannitol	
	Ribitol	
	D-Sorbitol	
	D-Threitol	
	D-Xylitol	
	Aldosen	L-Arabinose
		L-Fucose
D-Galactose		
D-Glucose		
D-Glucoheptose		
D-Mannose		
D-Ribose		
2-Desoxy-Ribose		
D-Xylose		
Ketosen	L-Erythrulose	
	D-Sedoheptulose	
Disaccharide	Cellobiose	
	D-Maltose	
	D-Saccharose	
Carbonsäuren	Gluconat	

**Tabelle 6-5.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener membranständiger Polyol Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber verschiedenen Substraten

	BP.9 pMM4a- mSldAB	BP.9 pADH- sldAB_Gal	BP9 pADH- sldAB1 _3504	BP9 pADH- sldAB2 _3504	BP.9 pADH- sldAB1_hans	BP.9 pADH- sldAB_med
<b>Gemischte Alkohole</b>						
1,2-Pentandiol	75±12	135±10	8±0	2±2	20±10	59±8
<b>Sekundäre Alkohole</b>						
2-Hexanol	17±16	22±35	11±8	31±12	14±14	29±4
2,3-Butandiol	92±32	104±35	63±28	6±8	36±35	143±58
2,4-Pentandiol	43±31	43±17	28±32	5±7	12±12	17±14
2,5-Hexandiol	22±15	6±5	29±16	62±11	6±7	10±10
3-Hexanol	74±37	61±28	24±30	18±1	13±1	45±10
<b>Zyklische Alkohole</b>						
Isopropanol	29±10	22±2	11±12	24±17	7±8	62±7
<i>myo</i> -Inositol	44±8	7±9	16±11	0±0	26±26	61±12
1,3-Cyclopentandiol	48±4	29±19	47±7	53±13	60±5	11±12
1,2-Cyclohexandiol	81±17	82±25	57±14	2±2	37±15	90±35
<b>Zuckeralkohole</b>						
D-Glycerol	91±19	127±23	58±18	0±0	11±9	48±11
D-Arabitol	172±25	161±25	196±77	142±30	38±13	119±38
D-Galactitol	32±4	42±33	4±8	1±2	7±7	22±16
<i>meso</i> -Erythritol	93±23	101±16	34±20	41±11	13±13	32±23
D-Mannitol	105±37	85±37	35±23	2±2	2±3	4±7
Ribitol	81±8	99±28	29±29	0±0	14±0	0±0
D-Sorbitol	133±24	64±31	24±29	2±2	16±23	111±72
<b>Aldosen</b>						
L-Arabinose	11±15	0±0	15±13	233±184	14±12	12±12
D-Glucose	0±0	0±0	5±9	46±13	4±6	0±0
D-Glucoheptose	1±1	20±22	0±0	27±11	0±0	66±17
D-Mannose	0±0	0±0	11±13	32±4	9±0	0±0
D-Ribose	48±25	11±16	13±11	110±76	15±8	10±5
2-Desoxy-Ribose	2±3	13±19	17±17	2±4	0±0	61±26
D-Xylose	0±0	0±0	6±6	20±20	58±8	0±0
<b>Ketosen</b>						
L-Erythrose	107±25	41±20	38±8	25±22	11±12	87±30
D-Sedoheptulose	4±4	19±14	6±9	6±10	5±9	32±22
<b>Disaccharide</b>						
Cellobiose	37±18	28±5	8±15	0±0	0±0	21±21
D-Maltose	0±0	0±0	0±0	56±79	5±8	0±0
D-Saccharose	4±5	0±0	12±14	32±46	13±13	0±0
<b>Carbonsäuren</b>						
Gluconat	25±17	21±18	2±2	17±19	9±10	0±0

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

**Tabelle 6-6.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener membranständiger Glucose Dehydrogenasen in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber verschiedenen Substraten

	BP.9 pMM4a- mGDH	BP.9 pADH- mGDH_ GAL	BP.9 pADH- mGDH1_ 3504	BP.9 pADH- mGDH2_ 3504	BP.9 pADH- mGDH1_ hans	BP.9 pADH- mGDH1_ PAI5	BP.9 pADH- mGDH_ med
<b>Aldosen</b>							
L-Arabinose	75±34	469±222	372±72	0±0	260±6	227±51	99±25
L-Fucose	74±74	23±24	7±7	0±0	47±15	0±0	80±19
D-Galactose	82±56	243±59	478±131	16±22	283±43	557±333	171±53
D-Glucose	508±163	810±176	957±163	12±17	306±61	602±45	487±88
D-Mannose	85±88	181±64	246±45	18±18	398±67	393±67	84±23
D-Glucoheptose	5±6	55±4	60±21	54±23	179±16	7±8	72±11
D-Ribose	30±38	104±25	42±10	56±2	168±31	25±25	10±13
D-Xylose	98±70	594±275	360±104	37±3	324±24	402±192	47±24
<b>Ketosen</b>							
L-Erythrose	26±34	46±9	33±32	0±0	78±49	13±9	35±2
<b>Disaccharide</b>							
Cellobiose	44±19	112±21	173±14	7±9	136±39	23±3	70±40
D-Maltose	75±79	20±7	202±31	0±0	258±9	0±0	10±20
D-Saccharose	16±23	142±5	6±8	9±13	0±0	71±50	83±69

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

**Tabelle 6-7.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener membranständiger Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber verschiedenen Substraten

	BP.9 pADH-mSDH_Gal	BP.9 pADH-sekADH_Gal	BP.9 pADH-mFuDH_Gal
<b>Gemischte Alkohole</b>			
1,2-Pentandiol	0±0	0±0	0±0
<b>Sekundäre Alkohole</b>			
2-Hexanol	0±0	249±201	3±6
2,3-Butandiol	23±22	134±30	5±8
2,4-Pentandiol	18±8	215±100	6±10
2,5-Hexandiol	9±5	126±91	12±22
3-Hexanol	0±0	0±0	1±1
<b>Zyklische Alkohole</b>			
1,3-Cyclopentandiol	23±17	29±4	0±0
1,2-Cyclohexandiol	25±35	26±24	0±0
<b>Zuckeralkohole</b>			
Glycerol	27±15	13±11	4±8
D-Arabitol	38±2	13±9	2±3
D-Galactitol	20±20	10±10	3±5
<i>meso</i> -Erythritol	46±10	6±8	7±12
D-Mannitol	1416±427	5±5	3±5
Ribitol	0±0	0±0	0±0
D-Sorbitol	135±8	9±6	0±1
Xylitol	54±29	15±21	8±14
<b>Aldosen</b>			
L-Arabinose	29±20	16±23	12±11
L-Fucose	3±5	2±3	46±8
D-Galactose	10±10	3±6	16±23
D-Glucose	6±6	11±20	3±5
D-Glucoheptose	15±26	15±30	12±11
D-Mannose	14±12	15±18	21±24
D-Ribose	36±21	20±18	13±20
D-Xylose	10±8	7±13	3±2
<b>Ketosen</b>			
L-Erythrose	19±26	34±23	17±15
<b>Disaccharide</b>			
Cellobiose	18±12	0±0	8±14
D-Saccharose	1±2	6±11	66±21

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

**Tabelle 6-8.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) verschiedener membranständiger Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber verschiedenen Substraten

BP9 pADH-gcd_XC3586	
Gemischte Alkohole	
1,3-Butandiol	225 $\pm$ 23
1,2-Pentandiol	131 $\pm$ 50
Sekundäre Alkohole	
2-Hexanol	123 $\pm$ 28
2,3-Butandiol	335 $\pm$ 23
2,4-Pentandiol	332 $\pm$ 41
2,5-Hexandiol	262 $\pm$ 89
Zyklische Alkohole	
1,3-Cyclopentandiol	143 $\pm$ 60
1,2-Cyclohexandiol	35 $\pm$ 38
Zuckeralkohole	
Glycerol	121 $\pm$ 42
D-Arabitol	142 $\pm$ 48
D-Galactitol	34 $\pm$ 13
meso-Erythritol	49 $\pm$ 2
D-Mannitol	147 $\pm$ 87
Ribitol	137 $\pm$ 64
D-Sorbitol	62 $\pm$ 28
D-Threitol	27 $\pm$ 6
Aldosen	
D-Galactose	27 $\pm$ 7
D-Ribose	114 $\pm$ 18
Carbonsäuren	
Gluconat	38 $\pm$ 25

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

**Tabelle 6-9.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) von Polyol Dehydrogenasen nach gerichteter Mutagenese in Ganzzell-DCPIP-Assays gegenüber Substraten, bei denen Einzelmutanten einen zusätzlichen Effekt gezeigt haben.

	BP.9 pADH- sldAB_Mut1	BP.9 pADH- sldAB_Mut2	BP.9 pADH- sldAB_Mut1+2	BP.9 pADH- sldAB_Mut3	BP.9 pADH- sldAB_Mut4
<b>Sekundäre Alkohole</b>					
2,3-Butandiol	174 $\pm$ 51	13 $\pm$ 18	47 $\pm$ 2	21 $\pm$ 19	3 $\pm$ 4
2,4-Pentandiol	52 $\pm$ 9	8 $\pm$ 6	47 $\pm$ 16	0 $\pm$ 0	13 $\pm$ 18
<b>Zyklische Alkohole</b>					
1,3-Cyclopentandiol	187 $\pm$ 55	26 $\pm$ 33	23 $\pm$ 9	124 $\pm$ 7	39 $\pm$ 5
1,2-Cyclohexandiol	185 $\pm$ 64	38 $\pm$ 22	66 $\pm$ 13	50 $\pm$ 13	51 $\pm$ 34
<b>Zuckeralkohole</b>					
D-Galactitol	4 $\pm$ 5	19 $\pm$ 16	46 $\pm$ 27	4 $\pm$ 4	32 $\pm$ 24
<i>meso</i> -Erythritol	91 $\pm$ 16	76 $\pm$ 21	134 $\pm$ 66	83 $\pm$ 61	5 $\pm$ 5
D-Mannitol	55 $\pm$ 17	88 $\pm$ 47	128 $\pm$ 18	22 $\pm$ 19	59 $\pm$ 8
Ribitol	74 $\pm$ 35	37 $\pm$ 26	126 $\pm$ 25	31 $\pm$ 4	33 $\pm$ 14
D-Sorbitol	188 $\pm$ 76	47 $\pm$ 31	121 $\pm$ 19	84 $\pm$ 48	80 $\pm$ 27
<b>Aldosen</b>					
D-Ribose	16 $\pm$ 12	70 $\pm$ 11	11 $\pm$ 15	62 $\pm$ 44	0 $\pm$ 0
<b>Ketosen</b>					
L-Erythulose	204 $\pm$ 77	45 $\pm$ 10	87 $\pm$ 30	27 $\pm$ 31	25 $\pm$ 35
<b>Carbonsäuren</b>					
D-Gluconat	6 $\pm$ 5	114 $\pm$ 96	34 $\pm$ 27	24 $\pm$ 15	61 $\pm$ 48

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

**Tabelle 6-10.** Oxidationsaktivität ( $\mu$ Units) von membranständigen Dehydrogenasen aus *G. albidus* TMW2.1191 gegenüber verschiedenen Antibiotika in Ganzzell-DCPIP-Assays.

	BP.9 pADH- mSDH_Gal	BP.9 pADH- mGDH_Gal	BP.9 pADH- mFuDH_Gal	BP.9 pADH- sldAB_Gal	BP.9 pADH- ADH_Gal
Cefoxitin	0 $\pm$ 0	3 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2	12 $\pm$ 10
Gentamicin	30 $\pm$ 33	7 $\pm$ 18	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 5	12 $\pm$ 17
Kanamycin	3 $\pm$ 4	11 $\pm$ 17	37 $\pm$ 21	6 $\pm$ 11	12 $\pm$ 13
Lincomycin	3 $\pm$ 6	1 $\pm$ 4	6 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 4
Polymyxin B	4 $\pm$ 7	7 $\pm$ 9	45 $\pm$ 11	5 $\pm$ 9	6 $\pm$ 6
Tetrazyklin	0 $\pm$ 0	14 $\pm$ 22	3 $\pm$ 5	9 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0

0  $\mu$ Units  1000  $\mu$ Units

**Tabelle 6-11.** Ergebnisse des Stammsammlung-Screenings mit dem modifizierten Seliwanoff-Test für die Produktion von 5-Keto-Gluconat in Biotransformationen mit 20 g L<sup>-1</sup> D-Gluconat.

	5-Keto-D-Gluconat (g L <sup>-1</sup> )
<i>A. indonesiensis</i> NBRC 16471	0,0 ± 0,0
<i>A. orleanensis</i> DSM 4492	0,2 ± 0,1
<i>A. aceti</i> DSM 3508	0,8 ± 0,3
<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0 ± 0,0
<i>A. pasteurianus</i> LMG 1513	0,3 ± 0,3
<i>A. pasteurianus</i> UMCC1786	0,3 ± 0,3
<i>A. pasteurianus</i> B803	3,1 ± 0,0
<i>Acetobacter species</i> B945	0,9 ± 0,2
<i>G. cerinus</i> Isolat 1	0,6 ± 0,2
<i>G. cerinus</i> Isolat 2	1,4 ± 0,6
<i>G. cerinus</i> Isolat 3	0,2 ± 0,0
<i>G. cerinus</i> DSM 9533	0,5 ± 0,2
<i>G. japonicus</i> LMG 1417	3,5 ± 0,6
<i>G. oxydans</i> DSM 46615	0,5 ± 0,1
<i>G. oxydans</i> DSM 3503	1,8 ± 0,5
<i>G. oxydans</i> DSM 7145	1,6 ± 0,5
<i>G. oxydans</i> 621H	2,3 ± 0,4
<i>G. oxydans</i> DSM 2003	1,9 ± 0,9
<i>G. oxydans</i> ATCC 9937	1,7 ± 0,2
<i>G. oxydans</i> DSM 3504	1,4 ± 0,5
<i>G. oxydans</i> DSM 50049	2,9 ± 0,5
<i>G. kondonii</i> NBRC 3266	0,3 ± 0,2
<i>G. albidus</i> TMW2.1191	0,6 ± 0,4
<i>G. frateurii</i> Isolat	2,8 ± 0,3
<i>Gluconobacter species</i> B789	1,1 ± 0,1
<i>Gluconobacter species</i> B790	3,4 ± 0,1
<i>Gluconobacter species</i> .018	2,5 ± 0,8
<i>Ga. liquefaciens</i> DSM 5603	1,3 ± 0,5
<i>Ga. diazotrophicus</i> DSM 5601	1,2 ± 0,2
<i>K. hansenii</i> LMG 1524	0,7 ± 0,5
<i>K. hansenii</i> LMG 1528	1,2 ± 0,5
<i>K. hansenii</i> LMG 1527	1,5 ± 0,7
<i>K. xylinus</i> DSM 6513	1,5 ± 0,6
<i>K. xylinus</i> UMCC 2756	0,5 ± 0,1
<i>K. medellinensis</i> LMG 1693	1,6 ± 0,5
<i>K. europaeus</i> UMCC 1744	0,9 ± 0,1
<i>Am. chiangmaiensis</i> NBRC 103196	0,6 ± 0,4
<i>T. sakaeratensis</i> NBRC 103193	1,4 ± 0,5
<i>As. lannensis</i> NBRC 102526	0,5 ± 0,2
<i>As. spathodeae</i> NBRC 105894	1,0 ± 0,3
<i>As. krungthepensis</i> NBRC 100057	0,9 ± 0,3
<i>As. bogorensis</i> Isolat	0,0 ± 0,0
<i>Asaia species</i> B955	0,7 ± 0,1
<i>N. chiangmaiensis</i> NBRC 101099	1,7 ± 0,8

```

SldA_621H      1 MRRSHLLATVACATLACAPLAANAQFAPAGSGGSSPTSSVPGPGNGSGNSFEPTENTPAAKSRFSGPSP
SldA_Gal      1 . . . . . A . V . . . . . AT . . . . . A . . . . . D . . . . . AT . . . . . GT . . . . .
SldA1_3504    1 . . . . . PY . . . . . SLA . TTL . FV . H . . . . . A . P . SA . I . . . . . KA . . . . . D . . . . . ARDA . PDP . Y . A . . . . .
SldA2_3504    1 . L . F . . GATII . GMS . TVAL . . . . . V . . . . . P . AEQP . . . . . KD . . . . . ATV . PTEPAPLADA . . . . . A . . . . .
SldA_hans    1 . L . L . . GATIITS . S . . . . . AAY . . . . . V . . . . . P . ADQP . . . . . T . . . . . ATV . PGEPAPVVDK . AA . . . . .
SldA_med

SldA_621H      69 YAPQAPGVNAANLPDIGSMDPNDVPMAPQQSASPASGDWAAAYGHDDSQMRYSPLEITPQNADQLKV
SldA_Gal      65 . . . . . A . Q . . . . . S . . . . . R . . . . . T . . . . .
SldA1_3504    69 . . . . .
SldA2_3504    65 . . . . . MD . I . ASAL . A . V . . . . . HD . . . . . T . . . . . N . T . . . . . DQ . . . . . E . VSK . E . . . . .
SldA_hans    56 N . . . . . G . . . . . I . . . . . GPPAE . SEATP . VE . VT . N . HD . PG . R . . . . . RAT . F . . . . . NQ . . . . . IGH . R . . . . .
SldA_med    56 N . . . . . I . . . . . GPPAE . SEATP . VE . VV . N . HD . PG . AR . . . . . KAT . . . . . DQ . . . . . A . VSH . R . . . . .

SldA_621H     137 AFVYHTGSYPRPQGQTNKWAAEETPIKVGDGLYMCSAQNDIMKIDPATGKEIWRHNINEKYEAIPYTTAA
SldA_Gal     133 . . . . . L . . . . .
SldA1_3504    137 . . . . . L . . . . .
SldA2_3504    133 . T . . . . . I . L . T . . . . . Q . . . . . L . V . . . . . S . . . . .
SldA_hans    124 . I . . . . . K . G . . . . . V . . . . . L . M . R . . . . . HFHA . . . . . S . . . . .
SldA_med    124 . I . . . . . K . G . . . . . M . . . . . L . M . R . . . . . HFHA . . . . . S . . . . .

SldA_621H     205 CKGVTYFTSSQVPEQGQCHNRILEGLTDMRLIAVDAATGNLCEGFGNGGQVNLMOQLGESVPGFVFSMT
SldA_Gal     201 . . . . . H . . . . . M . . . . .
SldA1_3504    205 . . . . .
SldA2_3504    201 . . . . . E . . . . . I . . . . . VE . . . . . EF . PT . H . . . . . A . . . . .
SldA_hans    192 . A . V . Y . . . . . T . . . . . EH . H . . . . . A . . . . . E . . . . . SED . KV . . . . . WH . M . . . . . K . M . . . . . AE . . . . .
SldA_med    192 . A . V . Y . . . . . T . . . . . EH . H . . . . . A . . . . . E . . . . . SED . KV . . . . . WH . M . . . . . K . M . . . . . AE . . . . .

SldA_621H     273 TPPPVVNGVVVVNHEVLGQRRWAPSGVIRGYDAESGKFLWAWDVNRPNDHSQPTGNNHYSRGTPNNSW
SldA_Gal     269 . . . . . I . . . . . N . . . . .
SldA1_3504    273 . . . . .
SldA2_3504    269 V . M . . . . . V . . . . . V . . . . . V . . . . . K . D . . . . .
SldA_hans    260 A . . . . . I . . . . . AIIT . Q . I . . . . . T . R . . . . . HE . GE . KEGE . . . . .
SldA_med    260 A . . . . . I . . . . . AIIT . Q . . . . . T . R . . . . . HE . GE . KEGE . . . . .

SldA_621H     341 AAMTGDNALGLVYVPTGNSASDYYSALRSP EENKVVSSAVVALDVKTGSPRWVFQTVHKDVWDYDIGSQ
SldA_Gal     337 . . . . . I . . . . . A . . . . . A . . . . .
SldA1_3504    341 . . . . .
SldA2_3504    337 . L . . . . . G . F . GY . . . . . A . TS . I . . . . . Y . TR . . . . . M . . . . .
SldA_hans    328 . . . . . I . . . . . A . . . . . M . . . . . I . . . . . E . . . . .
SldA_med    328 . . . . . I . . . . . A . . . . . M . . . . . I . . . . . E . . . . .

SldA_621H     409 ATLMDMPGQDGPVPALIMPTKRGQTFVLDRRDGKPI--LPVEERPAPSPGVIPGDPSPPTQPWSTGM
SldA_Gal     405 . . . . . A . . . . . T . . . . .
SldA1_3504    409 . . . . .
SldA2_3504    405 V . M . . . . . TP . . . . . T . . . . . I . V . . . . . T . S . . . . . A . NV . . . . . T . A . . . . . V . . . . .
SldA_hans    396 P . . . . . FTRP . . . . . ST . . . . . TDV . . . . . MV . D . T . A . . . . . V . . . . .
SldA_med    396 P . . . . . FTKP . . . . . SS . . . . . TEV . . . . . A . . . . . MV . . . . . V . . . . .

SldA_621H     475 PALRVPDLKETDMWGMSPIDQLFCRIKFRFRANTGFEFTPPSVDKPIWIEYPGYNGGSDWGSVSYDPQSG
SldA_Gal     471 . . . . . L . . . . . V . . . . . M . . . . .
SldA1_3504    475 . . . . .
SldA2_3504    470 . . . . . M . E . Q . K . . . . . L . . . . . Y . . . . . S . H . V . . . . . L . . . . . M . . . . . N . . . . . MA . . . . . ET . . . . .
SldA_hans    462 . R . GFAP . . . . . S . . . . . Y . L . Y . . . . . H . V . . . . . I . . . . . L . . . . . A . . . . . EK . . . . .
SldA_med    462 . R . GFAP . . . . . S . . . . . Y . L . Y . . . . . H . V . . . . . I . . . . . L . . . . . A . . . . . EK . . . . .

SldA_621H     543 ILIANWNI TPMYDQLVTRKKADELGLMPIDDPNYKPGGG-GAEGNGAMDGTPYGI VVTPFWDQYTGMM
SldA_Gal     539 . . . . . Q . . . . . N . . . . .
SldA1_3504    543 . . . . .
SldA2_3504    538 . . . . . AS . . . . . A . I . R . . . . . T . K . . . . . AVH . . . . . A . AS . . . . . P . E . . . . . A . TIA . . . . . PF . R . L . . . . .
SldA_hans    530 . . . . . N . . . . . S . . . . . K . . . . . V . . . . . A . . . . . AE . . . . . S . . . . . E . . . . .
SldA_med    530 . . . . . N . . . . . S . . . . . Q . . . . . V . . . . . A . . . . . AD . . . . . S . . . . . E . . . . .

SldA_621H     610 CNRPPYGMIT AIDMKHGQKVLWQHPLGTARANGPWGLPTGLPWEIGTPNNGGSSVVTAGGVVFI A AATD
SldA_Gal     606 . . . . . L . . . . .
SldA1_3504    610 . . . . .
SldA2_3504    606 . HK . . . . . I . K . L . . . . . G . . . . .
SldA_hans    597 . . . . . T . . . . . R . . . . . S . . . . . F . . . . . H . LN . . . . . P . I . . . . . LI . V . . . . . T . . . . .
SldA_med    597 . . . . . T . . . . . R . . . . . S . . . . . F . . . . . H . LT . . . . . P . I . . . . . LI . V . . . . . T . . . . .

SldA_621H     678 NQIRAIDEHTGKVVVWAVLPGGGQANPMTYEANGHQYVAIMAGGHFMMTPVSDQLVVYALPDHKG
SldA_Gal     674 . . . . .
SldA1_3504    678 . . . . .
SldA2_3504    674 . L . . . . . R . . . . . L . H . . . . . R . . . . . I . . . . . M . F . . . . . KG . TN . . . . .
SldA_hans    664 . M . H . F . I . . . . . E . ND . . . . . T . . . . . YK . K . . . . . T . D . . . . . DNT . N . . . . .
SldA_med    664 . M . H . F . I . . . . . E . ND . . . . . T . . . . . YK . K . . . . . T . D . . . . . DNV . N . . . . .

```

**Abbildung 6-2.** Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen der charakterisierten Polyol-Dehydrogenasen. Das Alignment wurde mithilfe der webbasierten Anwendung ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) unter Standardeinstellungen berechnet. Die Darstellung und Auswertung erfolgte mit dem Programm Jalview (Version 2.10.5). Als Referenzsequenz wurde die *SldAB\_621H* festgelegt, in den verbliebenen Sequenzen sind nur abweichende Aminosäuren gezeigt.



# III Publikationen

## Publikationen

Burger, C.; Kessler, C.; **Gruber, S.**; Ehrenreich, A.; Liebl, W.; Weuster-Botz, D. (2019). L-Erythrose production with a multideletion strain of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (11), S. 4393–4404.

## In Vorbereitung:

**Bode, S.**; Burger, C.; Weuster-Botz, D.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. Development of highly efficient L-erythrose producing whole cell catalysts using metabolic engineering. (in preparation)

## Beiträge zu Fachtagungen

**Gruber, S.**; Mientus, M.; Kostner, D.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2017). Development of *Gluconobacter oxydans* strains for the production of L-erythrose and 5-ketogluconate. Microbiology and Infection 2017, 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM, VAAM Annual Meeting 2017, 69th Annual Meeting of the DGHM. Würzburg. Germany

**Gruber, S.**; Burger, C.; Weuster-Botz, D.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2018). *G. oxydans* strains for the construction of tailor made whole cell catalysts. The 5th International Conference on Acetic Acid Bacteria. Freising. Germany

**Gruber, S.**; Liebl, W.; Ehrenreich, A. (2019). Genetically modified *G. oxydans* strains for the construction of specialized biocatalysts. Annual Conference 2019 of the Association for General and Applied Microbiology. Mainz. Germany

## IV Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Möglichkeit, meine Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der technischen Universität München durchzuführen, sowie für sein Interesse am Fortschritt und der Entwicklung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Erwin Grill und Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und der Rolle des Zweitprüfers für meine Promotion.

Dr. Armin Ehrenreich danke ich für die gute Betreuung während meiner Zeit an Lehrstuhl, für die vielen Diskussionen und Denkanstöße während der Besprechungen und für die Durchsicht meiner Dissertation.

Auch bei meinen Projektpartnern Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz und besonders Dr. Christian Burger am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik an der TUM möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und den regen Austausch herzlich bedanken.

Prof. Dr. Thomas Hofmann und Dr. Oliver Frank am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik an der TUM danke ich für die Durchführung und Auswertung der NMR-Messungen.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitglieder der AG Ehrenreich – Helga, Martin, Johannes, Markus und Ching-Ning, für die Unterstützung, die vielen Diskussionen, Ideen und vor allem für den Spaß, den ich mit euch hatte! Ein besonderes „Danke“ geht hier an David, der während meiner Masterarbeit meine Liebe zu den Essigsäurebakterien geweckt hat und mir auch anschließend mit seiner Erfahrung immer mit Rat zur Seite gestanden hat.

Auch meinen Studenten Friedericke, Dominik, Martina, Clara, Andrea, Helena, Kathi, Julia, Anna, Melania, Dinara, Katharina und Ludwig danke ich für das Interesse an dem Projekt, die vielen Fragen und Anregungen und die Unterstützung beim Produzieren von Ergebnissen.

Mein Dank gilt auch allen weiteren ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Lehrstuhls für Mikrobiologie für alle lustigen Gespräche und die schöne und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank geht an meine Familie...

... an meine Eltern und Brüder, die mir immer alle Freiheiten in meinen Entscheidungen gelassen haben, mich in allem unterstützt und meine Ausbildung erst ermöglicht haben.

... an meine Freunde, die immer an meiner Seite waren und für den nötigen Ausgleich gesorgt haben.

... und an meinen Mann Lars für die liebevolle Unterstützung, den Rückhalt, die Geduld und das Verständnis in den letzten Jahren!

## V Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift